

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie-Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Mohammad OZEIR** »

Thèse dirigée par « **Marc FONTECAVE** » et

codirigée par « **Fabien PIERREL** »

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM)**

dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant (EDCSV)**

Etude de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ chez *Saccharomyces cerevisiae*

Thèse soutenue publiquement le « **29 octobre 2012** »,
devant le jury composé de :

M^{me}. Geneviève DUJARDIN

Directeur de Recherche, CNRS, Université Paris 11, Rapporteur

Mr. Laurent AUSSEL

Maitre de conférence à l'Université Aix Marseille, Rapporteur

M^{me}. Agnès ROTIG

Directeur de Recherche, INSERM, Université Paris 5, Examineur

Mr. Eric FONTAINE

Professeur à l'Université Joseph Fourier, Président

Mr. Fabien PIERREL

Chargé de recherche CNRS, Université Joseph Fourier, Co-directeur

Mr. Marc FONTECAVE

Professeur au Collège de France, Directeur de thèse



Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France /
Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP

Cette thèse s'est déroulée au Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux dirigé jusqu'à 2010 par le professeur Marc Fontecave puis par le Dr. Stéphane Ménage. Je tiens à les remercier chaleureusement pour m'avoir accueilli dans le laboratoire et permis de travailler dans d'excellentes conditions. De plus, j'ai été honorée que le Prof. Marc Fontecave était le directeur de ma thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Dr. Fabien Pierrel, qui m'a formé à la recherche et soutenu pour obtenir une bourse de la région Rhône-Alpes. Je te remercie pour nos nombreuses discussions scientifiques, ton encadrement quotidien, tes disponibilités, pour les multiples re-lectures et conseils que tu m'as donné lors de la rédaction de ce manuscrit avec pour le rendre moins sec... Au travers de ces échanges, tu m'as permis une compréhension approfondie des divers aspects du sujet et tu m'as appris à travailler avec rigueur et pertinence. Ces trois années n'ont fait qu'accentuer mon intérêt pour la recherche. Enfin merci pour ton humanité, tu ne m'as jamais considéré comme ton étudiant mais plutôt ton ami...

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury d'avoir accepté de juger ma thèse: Mme Geneviève Dujardin, Mr. Laurent Aussel, Mme Agnès Rotig et Mr. Eric Fontaine.

Je tiens évidemment à remercier tous les membres du laboratoire pour toute l'humanité et l'amitié qu'ils m'ont apportées ainsi que pour les bons moments passés en leur compagnie. Merci à tous les permanents du labo: Cathy, Etienne, Hamid, Sandrine, Jeniffer, Vincent N, Murielle, Stéphane T, Stéphane M, Olivier, Adeline, Caroline et une pensée spéciale à notre secrétaire Nathalie.

Un grand merci à tout les jeunes du labo, les non permanents: Thibaut, Charlène, Alice, Phanely, Denis, Ulrika, Pavel, Salma, Jean, Trevor, Marine, Gustav, Antonin. Merci pour votre amitié.

J'ai aussi une pensée pour tous ceux qui ont déjà quitté le laboratoire: Simon A, Simon D, Elodie, Cécile, Florence, Emilie, Pascal, Martin, Eugene, Natty ainsi que tous les stagiaires que j'ai rencontré durant mon séjour au labo ...

Un remerciement particulier et très chaleureux s'adresse à toute la communauté Libanaise à Grenoble, particulièrement à: Louay, M. Jaber, H. Abbas, H. Bazzi, H. Ftouni, H. Jomah, Ibrahim, A. Mgharbel, M. Jawad, A. Hajj Hassan, M. Ghassani, Mahmoud, M. Mackiyeh, Wael, A. Ghadban, A. Hamzeh. Merci pour les bons moments passés avec vous en sortant se balader, lors des fréquents BarbQ, jeux au Foot, au Basket, au Ski...

Remerciement

Pour finir, je tiens à remercier toute ma famille, mes parents, ma sœur, mon grand père, toutes mes tantes, mon oncle et leurs enfants, pour avoir toujours cru en moi!!! Merci pour votre support et votre encouragement. Vous étiez tous, tout le temps, à côté de moi, je n'ai jamais senti la distance qui nous sépare...

A special thanks to Rajaa, known as 'RGFO', you were always beside me supporting me, helping me... Merci d'avoir supporté m'entendre parler des 'Coq' pendant 3 ans. Tout était impossible sans toi!

Sommaire

Abréviations.....	1
Introduction Générale	5
Introduction Bibliographique	8
I. Structure, distribution, propriétés redox et fonctions du coenzyme Q	8
I.1. Structure.....	8
I.2. Distribution	12
I.2.a. Les quinones chez les eucaryotes	12
I.2.b. Les quinones chez les bactéries.....	13
I.3. Propriété redox.....	13
I.4. Transport d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale	15
I.4.a. Les sites de réduction du coenzyme Q	15
I.4.a.I. Le complexe I: NADH-coenzyme Q-oxydoréductase	15
I.4.a.II. Le complexe II: succinate-coenzyme Q-oxydoréductase	16
I.4.b. Le site d'oxydation du coenzyme Q: le complexe III: coenzyme Q-cytochrome c-oxydoréductase	17
I.5. Antioxydant.....	19
I.6. Autres fonctions proposées du coenzyme Q	21
II. Biosynthèse du Coenzyme Q chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
II.1. Le 4-HB est le précurseur du noyau benzénique du coenzyme Q et des analogues de 4-HB peuvent être prényler par Coq2	25
II.2. Etapes de biosynthèse du coenzyme Q.....	27
II.2.a. Synthèse et attachement de la chaîne polyisoprényle	27
II.2.a .I. Synthèse de la chaîne polyisoprényle	27
II.2.a.II. Attachement de la chaîne polyisoprényle.....	27
II.2.b. Réactions de méthylation.....	28

II.2.b.I. O-Méthylation	28
II.2.b.II. C-Méthylation	30
II.2.c. Réactions d'hydroxylation	31
II.2.c.I. Hydroxylation de la déméthoxyubiquinone.....	31
(DMQ ₆): l'hydroxylation en C6	31
II.2.c.II. Les 2 autres réactions d'hydroxylation	33
II.2.d. Coq8	35
II.2.e. Protéines de fonction inconnue	36
II.2.f. Coq10 : Une nouvelle protéine de liaison du coenzyme Q	37
II.2.g. Le complexe protéique de la voie de biosynthèse du coenzyme Q chez <i>S. cerevisiae</i>	38
II.2.g.I. Les mutants Δ coq accumulent le HHB.....	38
II.2.g.II. Complémentation des mutants ponctuels coq par leurs homologues.....	39
II.2.g.III. Preuves biochimiques de l'existence du complexe	39
III. Déficience en coenzyme Q	41
III.1. Identification des mutations et signes cliniques.....	41
III.1.a. ADCK3/CABC1; COQ8.....	41
III.1.b. COQ2.....	42
III.1.c. PDSS1/PDSS2; COQ1	42
III.1.d. COQ9.....	43
III.1.e. COQ6.....	43
IV. Les sources d'électrons des oxygénases de la voie de biosynthèse du coenzyme Q.....	44
IV.1. Réductions des oxygénases.....	44
IV.2. Les oxygénases de la voie de biosynthèse du coenzyme Q	44
IV.3. Les ferrédoxines et les ferrédoxines réductases.....	45
Matériels et Méthodes.....	47

A. Matériels.....	47
I. Souches utilisées.....	47
I.1. Souches de levures.....	47
I.2. Souches bactériennes.....	48
I.2.a. E. coli DH5 α	48
I.2.b. E. coli BL21.....	48
II. Vecteurs plasmidiques et banque d'ADN génomique.....	49
II.1. Vecteurs levures.....	49
II.2. Vecteurs pour la surexpression hétérologue de la protéine Coq6.....	51
III. Milieux de culture.....	52
III.1. Milieux de culture de levure.....	52
III.1.a. Milieu complet : YP.....	52
III.1.b. Milieu minimum synthétique (YNB*).....	52
III.1.c. Milieu minimum synthétique-pABA-folate:(YNB-P).....	53
III.1.d. Milieu minimum synthétique avec 0.1% d'acide 5-fluoroorotique (5-FOA) (YNB*-5-FOA).....	53
III.1.e. Milieux solides utilisés pour la sporulation.....	53
III.2. Milieux de culture des bactéries.....	54
III.2.a. Milieu LB (Luria-Bertani).....	54
IV. Anticorps utilisés.....	54
IV.1. Anticorps primaires.....	54
IV.2. Anticorps secondaires.....	54
V. Produits chimiques et biologiques.....	55
V.1. Analogues de précurseurs du coenzyme Q ₆	55
V.2. Oligonucléotides.....	56

B. Méthodes	57
I. Biologie Moléculaire	57
I.1. Extraction d'ADN	57
I.1.a. Pour les bactéries	57
I.1.b. Pour les levures	57
I.2. Technique de la PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne)	58
I.2.a. Amplification de l'ADN	58
I.2.b. Mutagenèse dirigée	58
I.3. Clonage	59
I.3.a. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction	59
I.3.a.I. Digestion du fragment d'ADN obtenu par PCR.....	59
I.3.a.II. Digestion du plasmide	59
I.3.b. Ligation	60
I.4. Electrophorèse sur gel d'agarose	60
I.4.a. Pour le diagnostique	60
I.4.b. Purification d'ADN sur gel d'agarose.....	61
II-Transformation.....	61
II.1. Pour les bactéries	61
II.1.a. Préparation des bactéries compétentes.....	61
II.1.b. Transformation des bactéries par choc thermique	62
II.2. Transformation de <i>S. cerevisiae</i>	62
II.3. Banque de surexpression d'ADN génomique	63
III. Méthodes génétiques.....	63
III.1. Conjugaison des cellules haploïdes.....	63
III.2. Sporulation des cellules diploïdes et dissection des tétrades	64

III.3. Test de dilution en série	64
IV. Méthodes Biochimiques	65
Méthodes de separation.....	65
IV.1. Extraction des quinones	65
IV.2. Dosage de quinone par (HPLC-ECD).....	65
IV.3. Electrophorèse et analyse des protéines par Western-Blot	66
IV.3.a. Préparation d'extraits de protéines de levures	67
IV.3.b. Electrophorèse des protéines	67
IV.3.c. Electrotransfert des protéines	68
IV.3.d. Immunodétection des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose	68
V. Préparation des solutions des analogues de substrats	69
VI. Spectroscopie d'absorption UV-visible	69
VI.1. Dosage protéique.....	70
VI.1.a. Méthode de Bradford.....	70
VII. Surexpression et Purification de Coq6	70
VII.1. Surexpression de Coq6-MBP	70
VII.2. Préparation des extraits protéiques solubles	71
VII.3. Purification de Coq6 sur colonne	71
VII.3.a. Colonne de résine Amylose-MBP.....	71
VII.3.b. Colonne de tamisage moléculaire Superdex 200	72
VIII. Spectrométrie de masse.....	72
VIII.1. Spectrométrie de masse à haute résolution (HR-MS)	72
VIII.2. Analyse en HPLC couplée avec la spectrométrie de masse (HPLC-MS).....	72
VIII.2.a. Détection en mode MRM.....	73
Coq6: une mono-oxygénase qui catalyse l'hydroxylation en C5	75

I. La déplétion de la ferrédoxine mitochondriale Yah1 affecte l'hydroxylation en C5.....	75
I.1. La ferrédoxine mitochondriale Yah1 et la ferrédoxine réductase Arh1 sont essentielles pour la biosynthèse du coenzyme Q ₆	75
I.2. Accumulation de 3-hexaprényl-4-aminophénol (4-AP) et de 3-hexaprényl-4-hydroxyphénol (4-HP) dans la souche déplétée en Yah1	76
I.2.a. Spectrométrie de masse	76
I.2.b. Analyse par RMN.....	77
I.2.c. Spectres UV- visible.....	77
I.3. Le pABA et le 4-HB sont les précurseurs respectifs du 4-AP et du 4-HP.....	78
I.4. La formation de 4-AP et 4-HP résulte d'un déficit de l'hydroxylation en C5.....	80
I.5. Les précurseurs endogènes sont limitants pour la biosynthèse de Q ₆	81
II. Coq6 est l'hydroxylase C5 de la voie de biosynthèse du coenzyme Q ₆	81
II.1. Le mutant Δ coq6/Coq8 accumule le 4-AP et le 4-HP	82
II.2. Des mutations ponctuelles dans Coq6 inactivent la protéine et entraînent l'accumulation du 4-AP et 4-HP	84
II.2.a. Introduction des mutations dans Coq6.....	84
II.2.b. Les mutants ponctuels coq6 sont inactifs.....	85
II.2.c. Accumulation de 4-AP et de 4-HP dans les mutants ponctuels coq6	86
III. La perturbation du contenu mitochondrial en FAD entraîne l'accumulation de 4-AP et de 4-HP	88
III.1. Le mutant Δ flx1 accumule les mêmes intermédiaires que ceux accumulés dans les mutants coq6	88
III.2. La surexpression du gène FAD1 rétablit la biosynthèse du coenzyme Q ₆ dans Δ flx1 mais pas dans les mutants coq6 et la souche Gal-YAH1	90
IV. L'ajout d'analogues de 4-HB hydroxylés ou méthoxylés en C5, rétablit la biosynthèse du coenzyme Q ₆ dans les souches Gal-YAH1, coq6 et Δ flx1	91
IV.1. Restauration de la biosynthèse du coenzyme Q ₆ dans les souches Gal-YAH1, coq6 et Δ flx1.....	92

IV.2. Le coenzyme Q ₆ synthétisé à partir de VA ou 3,4-diHB est fonctionnel dans la chaîne respiratoire.....	94
IV.3. pABA et 4-HB sont des compétiteurs efficaces de l'entrée de VA dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q ₆	95
V. Relation entre Yah1 et Coq6.....	97
V.1. Coq6 est stable en absence de Yah1.....	97
V.1.a. Construction de la souche Gal-YAH1 COQ6-3HA.....	97
V.1.b. Western-blot	98
V.2. Les ferrédoxines humaines Fdx1 et Fdx2 ne complètent pas le défaut de biosynthèse du coenzyme Q ₆ dans la souche déplétée en Yah1.....	99
VI. Purification de Coq6.....	103
VI.1. Clonage et surexpression	103
VI.2. Purification de Coq6	104
VI.3. Caractérisation spectroscopique de la protéine Coq6	105
Discussion.....	106
Etude de la fonction de Coq8	112
I. Surexpression de Coq8 dans les différents mutants Δcoq	112
I.1. Accumulation de la DMQ ₆ dans $\Delta coq7/Coq8$	112
I.2. Accumulation de la DDMQ ₆ dans $\Delta coq5/Coq8$	114
I.3. Coq9 est essentielle pour les étapes d'hydroxylation en C5 et C6 de la voie de biosynthèse du coenzyme Q ₆	116
I.4. Accumulation d'intermédiaires précoces de la voie de biosynthèse du coenzyme Q ₆ dans les mutants $\Delta coq3/Coq8$ et $\Delta coq4/Coq8$	118
II. Les intermédiaires accumulés ne rétablissent pas la croissance sur milieu respiratoire	121
III. La surexpression de Coq8 entraîne la stabilité des autres protéines Coq.....	122
IV. L'effet stabilisateur de Coq8 est lié à son activité kinase	125

IV.1 Absence d'accumulation d'intermédiaires dans les mutants Δcoq surexprimant des formes inactives de Coq8	125
V. Effet de l'ajout d'analogues de 4-HB au milieu de culture des mutants $\Delta coq/Coq8$	128
V.1. Le mutant $\Delta coq7/Coq8$ synthétise de coenzyme Q_6 à partir du 2,4-diHB	128
V.1.a. Le coenzyme Q_6 synthétisé dans le mutant $\Delta coq7/Coq8$ à partir du 2,4-diHB est fonctionnel	130
V.2. L'ajout de VA entraîne l'accumulation de la DMQ_6 dans le mutant $\Delta coq3/Coq8$	131
V.3. Effet de l'ajout d'analogues de 4-HB sur le mutant $\Delta coq4/Coq8$	133
V.4. Déficience complète pour l'hydroxylation en C6 dans le mutant $\Delta coq9/Coq8$	135
Discussion	137
Analogues de substrats et déaminase	144
I. Effet d'analogues de substrats aminés sur les différents mutants Δcoq	144
I.1. Accumulation de l' $IDMQ_6$ dans les mutants $\Delta coq6/Coq8$ et $\Delta coq9/Coq8$	144
I.2. Gal-YAH1 et les mutants ponctuels $coq6$ accumulent aussi de l' $IDMQ_6$	147
I.3. Accumulation de la $DDMQ_6$ et de la DMQ_6 dans les mutants $\Delta coq5/Coq8$ et $\Delta coq7/Coq8$ respectivement	148
I.4. Accumulation de l' $IDMQ_6$ dans les mutants $\Delta coq3/Coq8$ en présence de l'AMB	150
II. Essai d'identification de la déaminase	151
II.1. Stratégie suivie pour identifier la déaminase	151
II.2. Crible génétique	153
II.3. Isolation des clones intéressants	155
III. Caractérisation des clones candidats	156
III.1. Le phénotype des clones est dû à la présence des plasmides	156
III.2. Mesure du contenu des clones en coenzyme Q_6	158
III.3. Séquençage	160
III.4. Transformation de $Coq6\Delta 9$ et $Coq6\Delta 16$ dans $\Delta coq6$	162

IV. Surexpression de Coq6 dans le mutant $\Delta coq9/Coq8$	164
V. Surexpression des isoformes humaines de Coq6 dans le mutant $\Delta coq6$	166
VI. Modélisation de la structure de Coq6 de <i>S. cerevisiae</i>	168
Discussion	170
Conclusion générale	177
Références bibliographiques	181
Annexe	194

Abréviations

WT	Wild-Type
Q	Ubiquinone
QH₂	Ubiquinol
QH°	Semiubiquinone
MK	Ménaquinone
DMK	Déméthyl-ménaquinone
Coq	Protéine impliquée dans la biosynthèse du coenzyme Q
COQ	Gène codant pour la protéine Coq
<i>coq</i>	Mutant du gène coq
<i>Δcoq</i>	Mutant de délétion du gène coq
4-HB	Acide 4-hydroxybenzoïque
pABA	Acide para-aminobenzoïque
VA	Acide vanillique
3,4-diHB	Acide 3,4-dihydroxybenzoïque
2,4-diHB	Acide 2,4-dihydroxybenzoïque
2,3,4-triHB	Acide 2,3,4-trihydroxybenzoïque
3O,4N-B	Acide 3-hydroxy-4-aminobenzoïque
AMB	Acide 3-méthoxy-4-aminobenzoïque
HHB	Acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque
HAB	Acide 3-hexaprényl-4-aminobenzoïque
DHHB	Acide 3-hexaprényl-4,5-dihydroxybenzoïque
HHAB	Acide 3-hexaprényl-4-amino-5-hydroxybenzoïque
DDMQ₆	Déméthyl-déméthoxyubiquinone
DMQ₆	Déméthoxyubiquinone
démétylQ₆	Déméthyl-ubiquinone
4-AP	Acide 3-hexaprényl-4-aminophénol

4-HP	Acide 3-hexaprényl-4-hydroxyphénol
DMAPP	Diméthylallyl diphosphate
IPP	Isopentényl diphosphate
MEP	2-C-méthyle-D-érythritol 4-phosphate
YP	Milieu complet
YNB*	Milieu minimum synthétique
YNB-P	Milieu minimum synthétique-pABA-folate
LB	Luria-Bertani
Glu	Glucose
Gal	Galatose
Lactate	Lactate
LG	Lactate-Glycérol
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
FADH₂/FAD	Flavine adénine dinucléotide réduite/oxydée
FMN	Flavine mononucléotide
NADH/NAD⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide réduite/oxydée
SAM/AdoMet	S-adénosylméthionine
AdoHcy	Adénosyl-homocystéine
EDTA	Acide Etylène Diamine Tétracétique
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside
BSA	Bovine Serum Albumin
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
MBP	Maltose Binding Protein
ADN	Acide DésoxyriboNucléique

HA	Séquences hémagglutinine
ERO	Espèces Réactifs de l'Oxygène
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
O₂[•]	Radical superoxyde
OH[•]	Radical hydroxyle
LOO[•]	Radical lipidique peroxydé
Fe³⁺-O₂[•]	Radical perferryle
ECD	Détection électrochimique
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPLC-ECD	HPLC couplée à la détection électrochimique
HPLC-MS	HPLC couplée à la spectrométrie de masse
MS	Spectrométrie de Masse
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDS-PAGE	SDS polyAcrylamide Gel Electrophoresis
UV	Ultra Violet
DO	Densité Optique
Da	Dalton
Ppm	Partie Par Million
Rpm	Tours par minute

Introduction Générale

Le coenzyme Q (ubiquinone ou Q) est une molécule organique lipophile composée d'une benzoquinone substituée notamment d'une chaîne polyisoprényle dont la longueur varie selon les organismes, 6 unités chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Q₆), 8 chez *Escherichia coli* (Q₈) et 10 chez les humains (Q₁₀). Q a la capacité d'échanger deux électrons au cours du cycle rédox entre sa forme réduite et oxydée et a un rôle bien connu de transporteur d'électrons dans les chaînes respiratoires en plus de fonctionner également comme un antioxydant membranaire (Turunen et al, 2004). L'importance de Q est démontrée chez les humains par les pathologies sévères causées par des mutations dans différents gènes de biosynthèse de Q (Quinzii & Hirano, 2010).

La biosynthèse de Q est un processus mitochondrial qui implique la participation d'au moins 9 protéines chez *S. cerevisiae* (Coq1-Coq9). Cette biosynthèse débute par la prénylation de l'acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB) par la protéine Coq2 et se poursuit avec sept étapes de modification du noyau benzénique (au total trois hydroxylations, trois méthylations et une décarboxylation). La plupart des protéines Coq (Coq3, Coq4, Coq5, Coq7, Coq9) sont organisées au sein d'un complexe et la suppression d'une protéine du complexe entraîne la dégradation de la plupart des autres (Tran & Clarke, 2007). Il en résulte que la plupart des mutants de délétion du métabolisme de Q ($\Delta coq3$ - $\Delta coq9$) accumulent l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque (HHB), un intermédiaire précoce de biosynthèse de Q qui n'est donc pas informatif de l'étape de biosynthèse déficiente dans un mutant donné.

L'absence d'accumulation d'intermédiaires diagnostiques de l'étape de biosynthèse déficiente dans les mutants Δcoq a donc compliqué l'identification des enzymes responsables des étapes de biosynthèse de Q. De nombreuses inconnues subsistent dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q: en plus de l'ambiguïté qui entoure le rôle exact de Coq6, on ne connaît pas non plus la protéine responsable de l'étape de décarboxylation ni la fonction de certaines protéines pourtant essentielles à la biosynthèse de Q (Coq4, Coq8 et Coq9). Au cours de cette thèse, nous avons cherché à découvrir les fonctions des protéines qui ne sont pas encore caractérisées (Coq6, Coq8 et Coq9). Nous avons montré en 2010, juste après mon arrivée au laboratoire qu'en plus de l'acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB), l'acide para-aminobenzoïque (pABA) est, lui aussi, un précurseur du noyau benzénique de coenzyme Q (Pierrel et al, 2010). La synthèse de Q à partir

du pABA suggère l'existence d'une étape de déamination que nous avons aussi essayé de caractériser.

Introduction Bibliographique

I. Structure, distribution, propriétés redox et fonctions du coenzyme Q

I.1. Structure

Les quinones isoprénoides sont des composés lipidiques associés aux membranes et sont présentes quasiment chez tous les organismes vivants. Elles sont composées d'une tête polaire et d'une chaîne latérale hydrophobe. Cette chaîne isoprénoïde apolaire confère à ces molécules leur caractère liposoluble facilitant ainsi leur ancrage dans les bicouches lipidiques membranaires alors que la tête hydrophile (noyau quinone) permet l'interaction avec les parties hydrophiles des protéines. La grande majorité des quinones isoprénoides biologiques appartient à la famille des naphtoquinones et benzoquinones. Les deux groupes les plus répandus de benzoquinones sont les ubiquinones et les plastoquinones qui diffèrent entre eux par les substituants des noyaux quinones.

La structure de l'ubiquinone, préférentiellement appelée coenzyme Q (Q), est présentée dans la figure 1. Le coenzyme Q est donc composé d'un noyau quinone et d'une longue chaîne hydrophobe constituée d'unités de 5 carbones qu'on appelle isoprène.

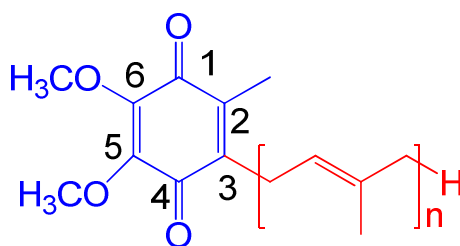


Figure 1: Structure du coenzyme Q sous sa forme oxydée. Le noyau quinone substitué est représenté en bleu et la chaîne polyisoprényle en rouge. La numérotation des atomes de carbone utilisés dans ce manuscrit est montrée.

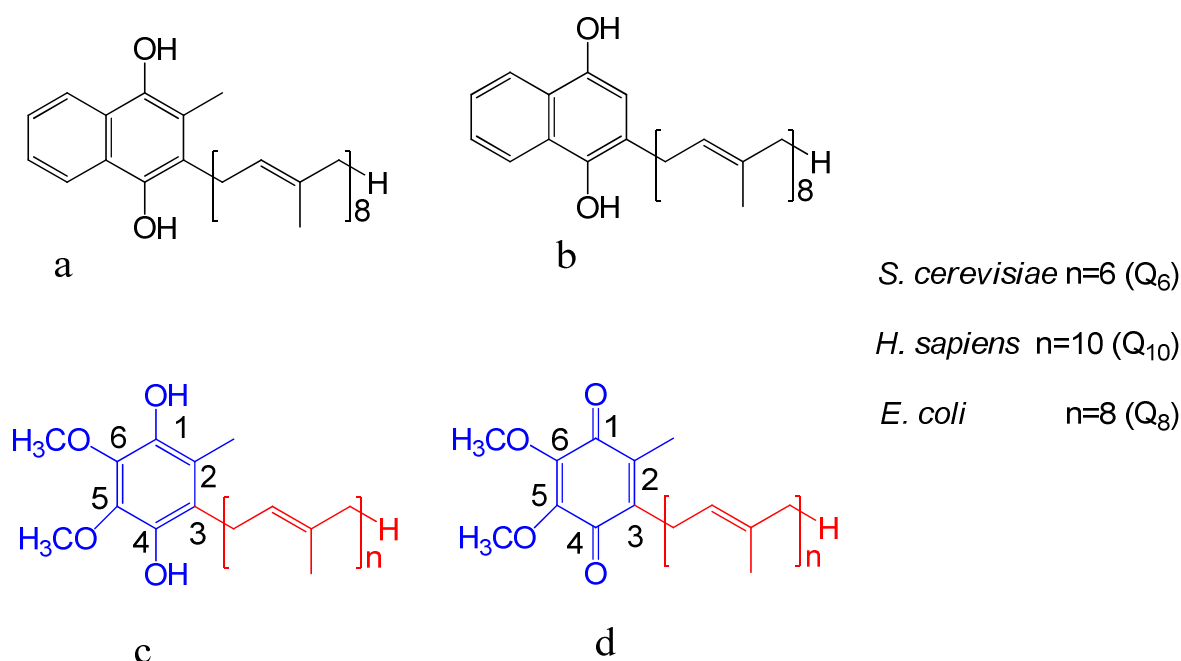


Figure 2: Les structures de différentes quinones.

a: Ménaquinone réduite; b: déméthyl-ménaquinone réduite; c: forme réduite du coenzyme Q; d: forme oxydée du coenzyme Q.

1.1.a. Le noyau quinone

Le noyau quinone est substitué par 2 groupements méthoxyles en C5 et C6, un méthyle en C2 et la chaîne polyisoprényle en C3. Il existe enfin deux fonctions cétones en para sur ce noyau qui est une quinone (figure 2-d) ou deux fonctions alcool dans la forme réduite quinol (figure 2-c).

Ce noyau est dérivé de la voie du shikimate via le chorismate chez les bactéries ou de la tyrosine chez les eucaryotes supérieurs (Bentley, 1990; Meganathan, 2001). Le micro-organisme eucaryote, *Saccharomyces cerevisiae*, peut synthétiser du coenzyme Q soit à partir du chorismate ou de la tyrosine (Olson & Rudney, 1983) (figure 3).

Les groupes méthyles sur le noyau benzénique sont dérivés de la S-adénosylméthionine (SAM). Chez les eucaryotes, l'isopentényl diphosphate (IPP), nécessaire pour la formation de la chaîne latérale isoprényle, est dérivé de l'acétate via la voie mévalonate. Chez les bactéries, il est formé

par le 2-C-méthyle-D-érythritol 4-phosphate (MEP), un intermédiaire de la voie non mévalonate (Disch & Rohmer, 1998; Rohmer, 1999) ou MEP (figure 3).

1.1.b. La chaîne polyisoprényle

Quant à la chaîne polysioprényle, c'est une longue chaîne hydrophobe constituée d'unités de 5 atomes de carbone qu'on appelle isoprène (figure 1) et qui donne au coenzyme Q la particularité d'être liposoluble. La taille de cette chaîne polyisoprényle est la base des deux nomenclatures communément utilisées pour classifier les nombreux composés de la famille des ubiquinones. La première regroupe ces molécules sous le terme de coenzyme Q_n, où n représente le nombre d'unités isoprène. La seconde désigne ces composés comme étant des ubiquinones n, avec n représentant le nombre de carbones totaux de la chaîne isoprénoïde. Ainsi, le coenzyme Q₁₀ correspond à l'ubiquinone 50, le coenzyme Q₆ correspond à l'ubiquinone 30, etc. De nos jours, la nomenclature la plus utilisée est la coenzyme Q_n et donc je vais l'utiliser dans la suite de ce manuscrit.

La longueur de cette chaîne polyisoprényle est très variable selon les organismes, 6 unités chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Q₆), 8 chez *Escherichia coli* (Q₈), 10 chez les humains (Q₁₀). A l'extrémité de cette chaîne, le noyau quinone représente la partie hydrophile du coenzyme Q.

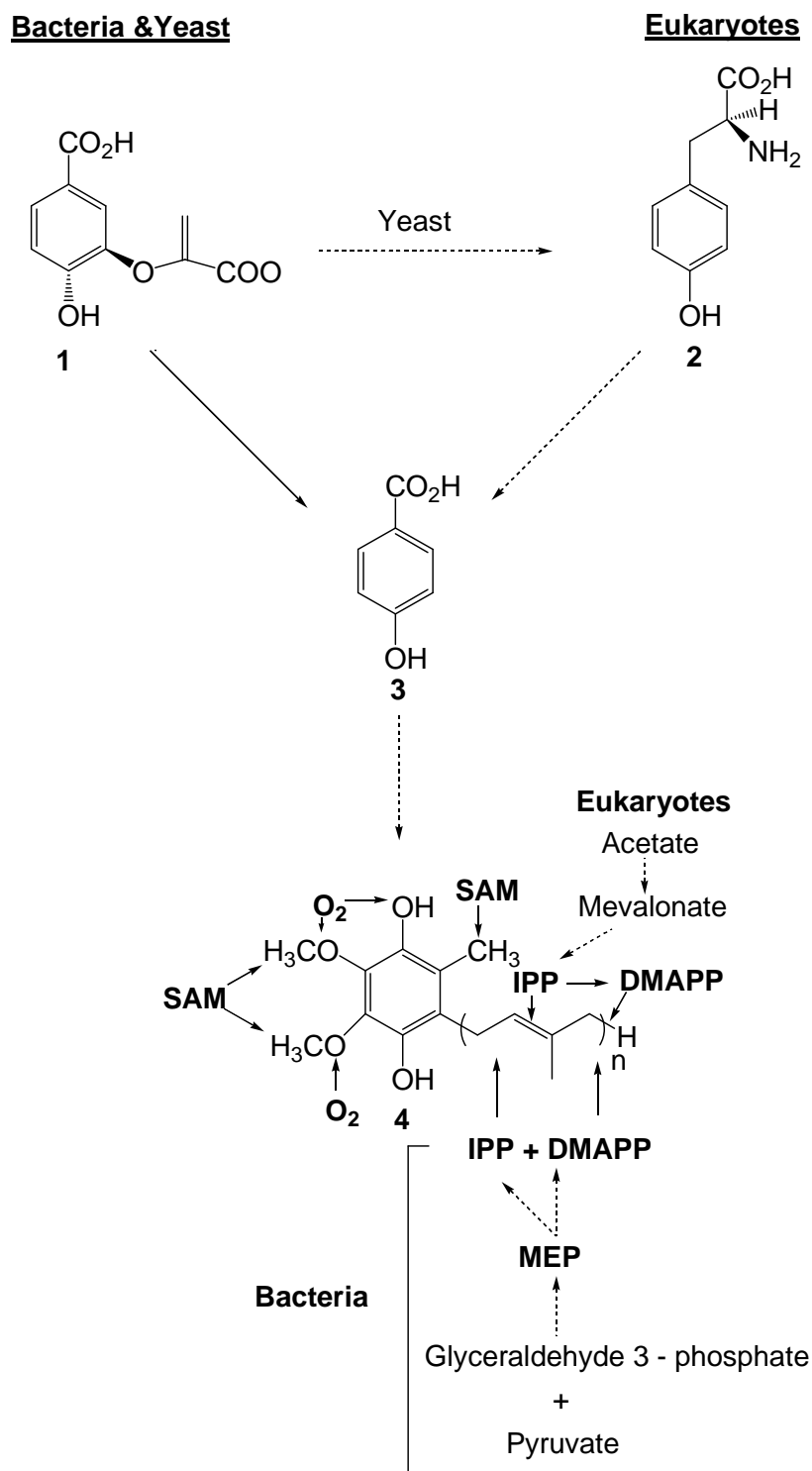


Figure 3: Structure et précurseurs biosynthétiques du coenzyme Q. 1: acide chorismique; 2: tyrosine; 3: acide 4-hydroxybenzoïque; 4: ubiquinol; SAM: S-adenosylméthionine; IPP: isopentényl diphosphate; DMAPP: diméthylallyl diphosphate; MEP: 2-C-méthyle-D-érythritol 4-phosphate. (Adapté de (Meganathan, 2001)).

I.2. Distribution

Les quinones isoprénoïdes du benzène et des naphtalènes sont très répandues chez les microorganismes. Les bactéries aérobies Gram-négatives et les eucaryotes contiennent uniquement le coenzyme Q (benzoquinone), tandis que les bactéries aérobies facultatives telles qu'*E. coli* contiennent, en plus du coenzyme Q, la déméthyl-ménaquinone (DMK) et la ménaquinone (MK), deux naphtoquinones (Collins & Jones, 1981) (figure 2). Par contre le coenzyme Q est absent chez les archées.

I.2.a. Les quinones chez les eucaryotes

Certains organismes possèdent plus qu'un seul type du coenzyme Q mais généralement, une seule forme est dominante. En effet, la plupart des mammifères, y compris les humains synthétisent une faible quantité du coenzyme Q₉ en plus du coenzyme Q₁₀ alors que le coenzyme Q₉ est majoritairement synthétisé chez les rongeurs (Nowicka & Kruk, 2010). Chez les invertébrés, les coenzymes Q₈, Q₉ et Q₁₀ ont été identifiés (Nowicka & Kruk, 2010). Le coenzyme Q₁₀ est synthétisé chez *Schizosaccharomyces pombe* tandis que le coenzyme Q₆ domine chez *S. cerevisiae* (Kawamukai, 2002; Takahashi et al, 2010). En outre, les mitochondries des plantes supérieures contiennent du coenzyme Q₁₀ ou coenzyme Q₉, tandis que celles des plantes inférieures pourrait avoir également du coenzyme Q₇ et du coenzyme Q₈ (Nowicka & Kruk, 2010). Exceptionnellement, du coenzyme Q₁₁ a été détecté, en plus des homologues plus courts, dans les fruits de *Capsicum* (Nowicka & Kruk, 2010).

Le coenzyme Q, synthétisé dans les organismes, n'étant pas soluble dans l'eau, on le rencontre quasiment dans toutes les membranes lipidiques, en particulier la membrane interne mitochondriale de *S. cerevisiae* et la membrane plasmique des bactéries où il peut diffuser librement parmi les phospholipides membranaires (Ernster & Dallner, 1995). Chez les humains, on retrouve le coenzyme Q dans les membranes biologiques de tous les tissus et il est également fixé aux lipoprotéines dans le sang (Crane, 2007).

I.2.b. Les quinones chez les bactéries

E. coli est une bactérie anaérobie facultative Gram- qui contient trois quinones membranaires ayant toutes une chaîne octaprényle (8 unités isoprène): Q_8 , DMK_8 et MK_8 (Meganathan, 2001) (figure 2). La synthèse de Q_8 , DMK_8 et MK_8 est régulée selon les conditions de culture aérobies ou anaérobies (Soballe & Poole, 1998). En fait, Q_8 est la quinone majoritaire en conditions aérobies alors que DMK_8 et MK_8 sont prédominantes lors d'une culture en anaérobiose (absence d'oxygène) (Alexander & Young, 1978).

E. coli utilise ces quinones aux potentiels rédox différents (+112 mV pour Q/QH_2 , +36 mV pour DMK_8/DMK_8H_2 et -74 mV pour MK_8/MK_8H_2) en fonction des accepteurs terminaux d'électrons des chaînes respiratoires (dioxygène en aérobiose; fumarate, nitrate ... en anaérobiose).

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la voie de biosynthèse du coenzyme Q_6 chez *S. cerevisiae*. Q_6 a une masse moléculaire de 590.88 daltons sous sa forme oxydée, ubiquinone et 592.88 daltons sous sa forme réduite, ubiquinol.

Dans la suite de ce manuscrit, je vais utiliser les termes 'ubiquinone (Q)' pour faire référence à la forme oxydée du coenzyme Q et 'ubiquinol (QH_2)' pour désigner la forme réduite.

I.3. Propriété redox

La réduction du noyau quinone du coenzyme Q en noyau quinol se fait grâce au gain de deux électrons et des deux protons. Le processus de réduction débute par le gain d'un premier électron ce qui conduit à la fixation d'un premier proton et va donc aboutir à la formation d'une semi-quinone intermédiaire QH^\bullet (figure 4). Ensuite l'ajout d'un deuxième électron permet la fixation d'un deuxième proton et donc l'obtention de la forme réduite quinol (figure 4). L'ensemble ubiquinone/ubiquinol (ou coenzyme Q/coenzyme QH_2) est un couple d'oxydoréduction dont le potentiel standard est de +112 mV. La réduction du coenzyme Q se fait par les complexes I et II de la chaîne respiratoire mitochondriale. QH_2 est ensuite oxydée par le complexe III grâce auquel les électrons fournis par QH_2 permettent de réduire le cytochrome c ferrique en cytochrome c ferreux, dont le potentiel d'oxydoréduction est de +255 mV. Cette réaction d'oxydoréduction couplée est exergonique et libère 39 kJ/mol. Cette énergie est utilisée

par le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale pour déplacer des protons depuis la matrice vers l'espace inter membranaire (figure 5).

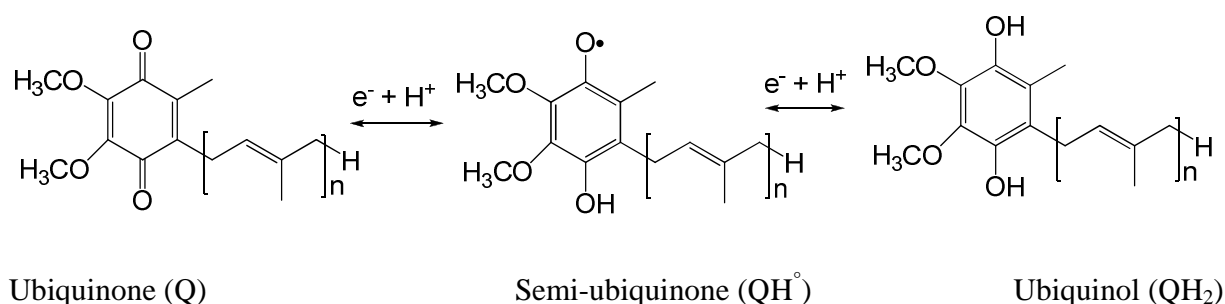


Figure 4: Les différents états redox du coenzyme Q.

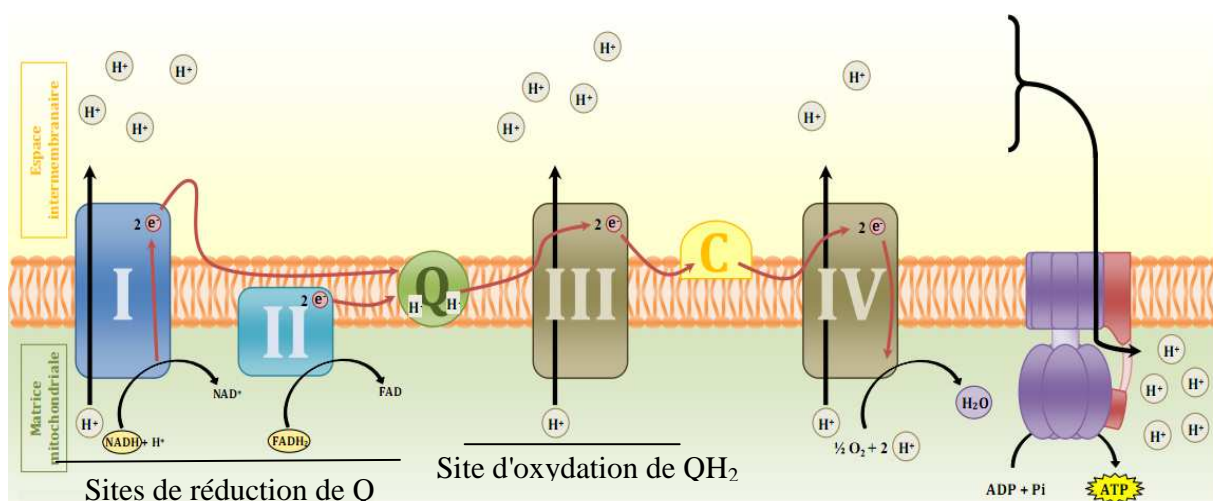
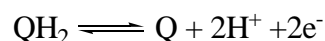


Figure 5: Schéma simplifié représentant les réactions de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la synthèse de l'ATP par phosphorylation oxydative. I: Complexe I, NADH-coenzyme Q oxydoréductase (absent chez *S. cerevisiae* et remplacé par 3 NADH déshydrogénases); II: Complexe II, succinate-coenzyme Q oxydoréductase; III: complexe III, coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase; IV: Complexe IV, cytochrome c oxydase; V: Complexe V, ATP synthase; Q: Coenzyme Q; C: Cytochrome C; Le coenzyme Q intervient dans la chaîne respiratoire en tant que transporteur d'équivalents réducteurs. Q est réduit par les complexes I et II en QH₂ qui est à son tour réoxydé en Q au niveau du complexe III.

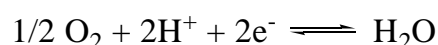
I.4. Transport d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale

La capacité du coenzyme Q de cycler entre une forme oxydée et une forme réduite est utilisée dans la chaîne respiratoire, qui assure la production d'énergie utilisable par la cellule sous forme d'ATP (figure 5). Plus particulièrement, le coenzyme Q assure le transfert d'électrons du complexe I et II au complexe III dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

Au cours d'une cascade de réactions, l'ubiquinone (Q) est réduit en ubiquinol (QH₂) qui est à son tour réoxydé en Q.



Le résultat final est la réduction du dioxygène en eau.



I.4.a. Les sites de réduction du coenzyme Q

I.4.a.I. Le complexe I: NADH-coenzyme Q-oxydoréductase

Le complexe I (figure 6) catalyse le transfert de deux électrons du NADH (formé notamment au cours du cycle de Krebs) au coenzyme Q via la flavine mononucléotide (FMN) et un ensemble de six cofacteurs fer-soufre [Fe - S]. Le complexe I est la première pompe à proton de la chaîne respiratoire. L'oxydation du coenzyme NADH qui a lieu sur la face matricielle de la membrane par la NADH-déshydrogénase produit deux électrons qui sont transférés à la FMN pour donner FMNH₂. La FMN est une sorte de "convertisseur" d'un flux bi-électronique en un flux mono-électronique, puisqu'elle cède ses électrons un par un aux centres [Fe - S], accepteurs mono-électroniques. Ces centres [Fe - S] cèdent à leur tour cet électron au coenzyme Q qui est réduit en passant par un intermédiaire semi-quinone.

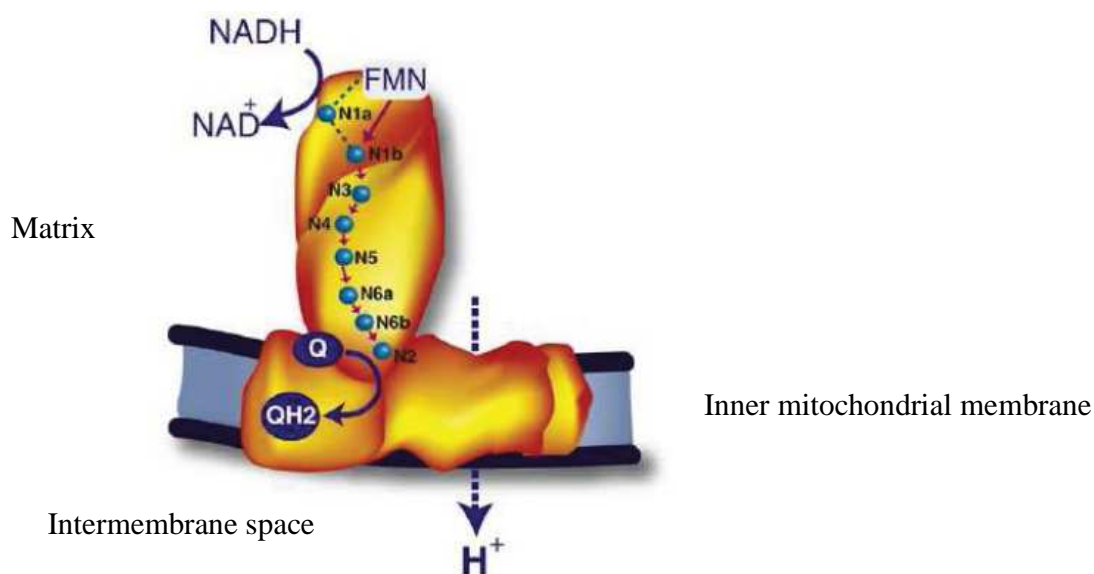


Figure 6: Schéma représentatif du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale des eucaryotes supérieurs montrant la réduction du coenzyme Q. Les flèches violettes représentent le parcours préférentiel des électrons, les pointillés verts les chemins accessoires. Les ronds bleus correspondent aux centres [Fe – S].

I.4.a.II. Le complexe II: succinate-coenzyme Q-oxydoréductase

Le complexe II de la chaîne respiratoire est une protéine composée de 4 sous-unités (SdhA, SdhB, SdhC et SdhD), toutes codées par le génome nucléaire. Deux sont incluses dans la membrane interne de la mitochondrie (SdhC et SdhD), les deux autres sont liées aux premières sur la face matricielle de la membrane. Le succinate, substrat de l'enzyme, est oxydé en fumarate par les sous-unités internes, qui contiennent un coenzyme FAD lié de manière covalente et plusieurs groupements [Fe – S]. Les hydrogènes sont transférés au coenzyme Q de la membrane par les sous-unités enchâssées dans celle-ci, où on trouve un cytochrome b558. Le complexe II et le trajet des électrons sont présentés dans la figure 7.

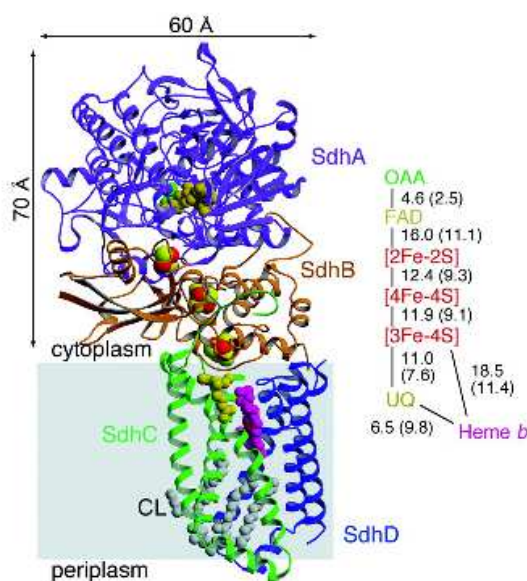


Figure 7: Structure du complexe II d'*E. coli*. Les électrons sont pris en charge par le FAD au niveau matriciel puis passent d'un groupement [Fe – S] à l'autre jusqu'au site de liaison du coenzyme Q (UQ) (D'après (Yankovskaya et al, 2003)).

I.4.b. Le site d'oxydation du coenzyme Q: le complexe III: coenzyme Q-cytochrome c-oxydoréductase

Les électrons venant de QH₂ sont cédés par le complexe III au cytochrome c qui les délivre au complexe IV. Le trajet des électrons dans le complexe III n'a été résolu que quand un trajet circulaire, appelé cycle Q, fût suggéré par Peter Mitchell puis détaillé entre autres par Bernard Trumpower (Trumpower, 1976) (figure 8).

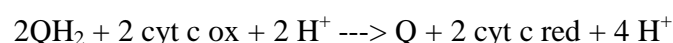
Le complexe III est un complexe multiprotéique et plusieurs sous-unités interviennent directement dans le cycle Q: la protéine de Rieske et son centre [2Fe - 2S], le cytochrome c1 porteur d'un hème et le cytochrome b qui possède deux hèmes. L'oxydation de l'ubiquinol suit plusieurs étapes:

- Fixation d'une molécule QH₂ au site Q_o, qui correspond à une zone mixte entre la protéine de Rieske et le cytochrome c1. Fixation concomitante d'une molécule d'ubiquinone au site Q_i, située sur le cytochrome b.

- Les deux électrons de QH₂ au site Q_o sont distribués de façons divergentes: l'un au centre [2Fe - 2S] de la protéine de Rieske, l'autre à l'hème b_L du cytochrome b. Les deux protons sont expulsés vers l'espace intermembranaire.
- L'électron capté par les centres [Fe - S] est transféré à l'hème du cytochrome c₁, puis au cytochrome c. Ce cytochrome c, une fois réduit, se détache du complexe III.
- L'électron capté par l'hème b_L est transmis à l'hème b_H du cytochrome b, il réduit ensuite Q du site Q_i en QH[•].
- Un second cycle, initié au site Q_o à partir d'une deuxième molécule QH₂, est nécessaire pour compléter la réduction du QH[•] au site Q_i. Les deux protons nécessaires à la réduction de ce coenzyme Q sont pris dans la matrice mitochondriale.

Le bilan de la réaction est l'oxydation de deux ubiquinols QH₂ au site Q_o et la réduction d'une ubiquinone Q au site Q_i. Deux électrons sont transférés à deux molécules de cytochrome c et quatre protons sont transférés vers l'espace intermembranaire. La quinone oxydée retourne vers les complexes I ou II pour être à nouveau réduite. Le cycle Q permet ainsi de doubler l'efficacité du coenzyme Q dans la génération du gradient de protons nécessaire à la synthèse d'ATP.

Bilan du cycle Q :



La chaîne respiratoire est une source permanente d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Selon certains auteurs, environ 0,4 à 0,8% de l'oxygène utilisés par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des ERO (Hansford et al, 1997). La production des ERO dans le complexe III résulte de la réduction partielle de Q. L'électron libre provenant du transfert à travers la chaîne respiratoire s'apparie avec Q formant le radical semi-ubiquinone (QH[•]) qui est instable. Un deuxième électron est donc nécessaire pour le stabiliser et permettre le transfert de proton grâce à l'intermédiaire ubiquinol (QH₂). Toutefois, il existe une probabilité pour que QH[•] rencontre une molécule d'oxygène avant d'être stabilisé par le deuxième électron. La molécule d'oxygène va alors capter l'électron libre générant ainsi un anion superoxyde (Turrens et al, 1985).

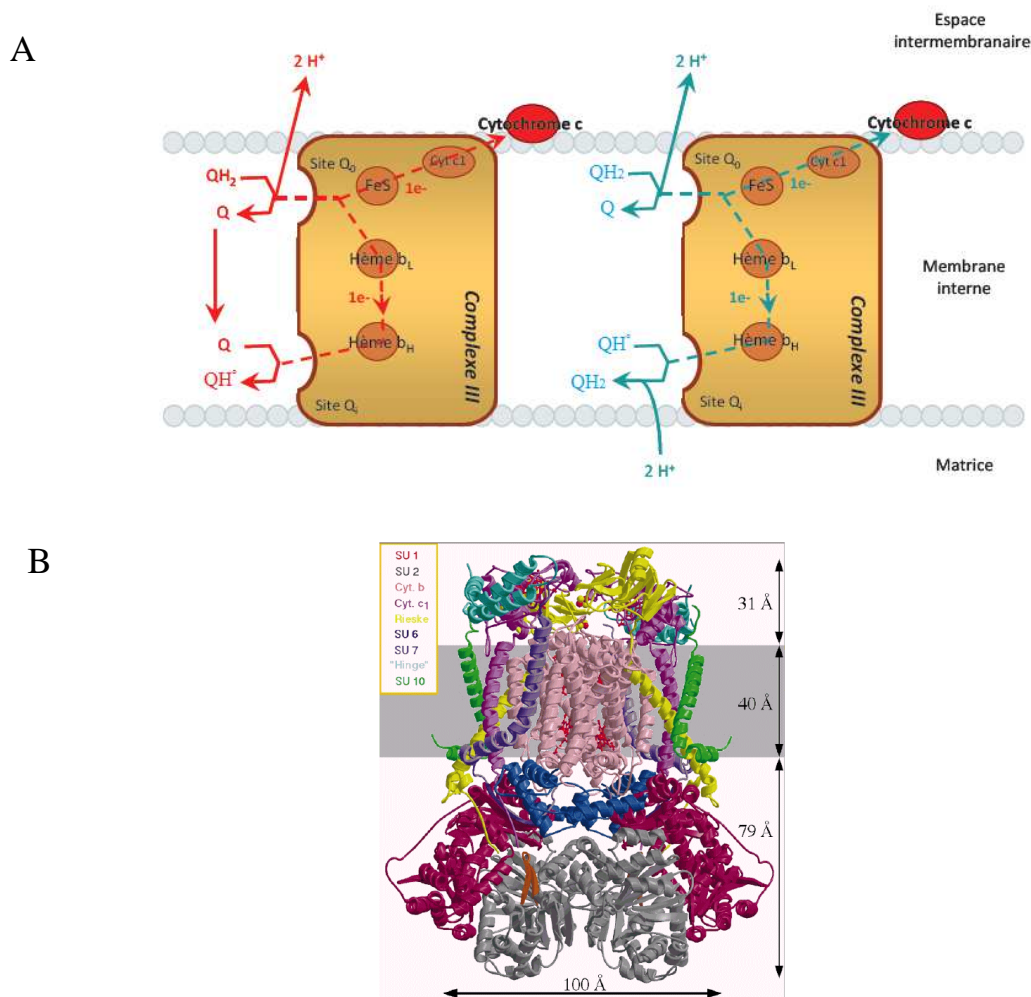


Figure 8: A) Représentation du cycle Q et B) Structure du complexe III du poulet (Zhang et al, 1998). Les coenzymes QH_2 provenant des complexes I ou II subissent des cycles d'oxydo-réduction successifs au niveau du complexe III. La première réaction d'oxydo-réduction est schématisée en rouge et la deuxième en bleu. Les flèches en pointillées schématisent le trajet des électrons à travers le complexe III. QH_2 : ubiquinol; Q: ubiquinone; QH^\bullet : semi-ubiquinone.

I.5. Antioxydant

L'ubiquinol (QH_2) joue un rôle important dans la bioénergie mitochondriale et est le seul antioxydant liposoluble synthétisé *de novo*. Il fait partie, avec les tocophérols, les caroténoïdes et les œstrogènes, des lipides naturellement antioxydants. Une grande quantité de données recueillies au cours des dernières années par des expériences sur des liposomes, des

mitochondries, des microsomes et sur des lipoprotéines ont démontré que QH₂ joue un rôle comme un antioxydant efficace et inhibe la peroxydation lipidique induite par les ERO (Bentinger et al, 2007). Les ERO sont des espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres, rendus chimiquement très réactifs par la présence d'électrons de valence non appariés. Il peut s'agir par exemple du radical superoxyde O₂^{•-}, de l'oxygène singulet ¹O₂, du radical hydroxyle OH[•]...

L'efficacité du coenzyme Q comme inhibiteur de la peroxydation lipidique provient du fait que QH₂ agit à différents niveaux du processus de peroxydation (figure 9). La principale action est de prévenir la production des radicaux lipidiques peroxydés (LOO[•]) lors de la réaction dite d'initiation par le radical perferryle (Fe³⁺-O₂^{•-}). QH₂ réduit le radical perferryle ce qui entraîne la formation du semi-ubiquinone et de H₂O₂. La deuxième action probable de QH₂ est d'éliminer LOO[•] directement et de régénérer efficacement la vitamine E à partir du radical α-tocopheroxyle (VitE-O[•]), empêchant ainsi le processus de propagation. (Mukai et al, 1990).

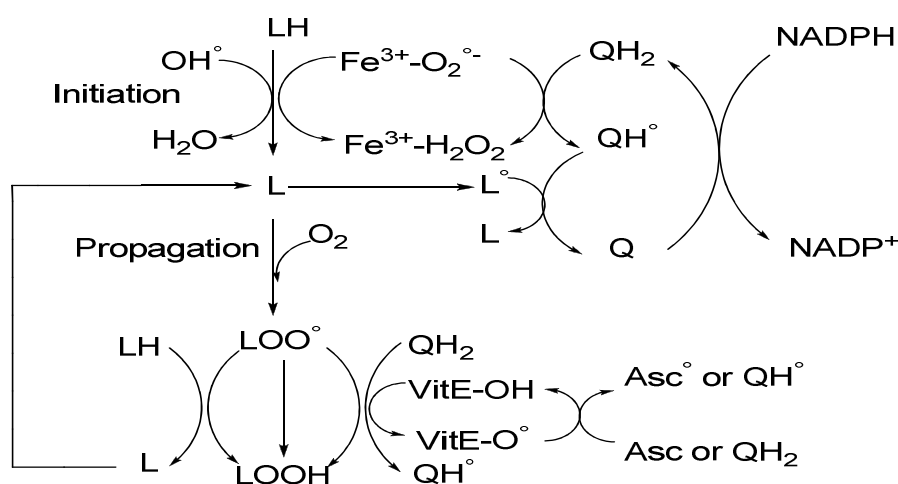


Figure 9: Sites d'action du coenzyme Q sur la peroxydation lipidique. LH: acide gras polyinsaturés; OH[•] : radical hydroxyle; Fe³⁺-O₂^{•-} : radical perferryle; QH₂ : ubiquinol; QH[•] : semiubiquinone; L: radical centré du carbone; LOO[•] : radical lipidique peroxydé; LOOH: hydroperoxyde des lipides; VitE-O[•] : radical α-tocopheroxyle; asc: radical ascorbyle (Adaptée de (Bentinger et al, 2007)).

QH₂ est efficace pour lutter contre la peroxydation lipidique, mais également contre l'oxydation protéique en empêchant sa propagation (Stadtman & Levine, 2000). Il existe plusieurs mécanismes d'oxydation des protéines et il semble que le plus commun soit l'oxydation

directe de résidus d'acides aminés (Stadtman & Levine, 2000). La relation spatiale étroite entre le coenzyme Q et les protéines membranaires est ainsi un facteur essentiel pour son effet protecteur contre l'oxydation des protéines aussi bien que contre l'oxydation des lipides.

De plus, au cours du stress oxydatif, O_2^- oxyde les centres [4Fe - 4S] des déshydratases, relâchant du fer libre dans le cytosol. Ce fer libre catalyse la réaction de Fenton, générant le radical hydroxyle OH° qui attaque l'ADN (Ernster & Dallner, 1995). QH_2 empêche d'une manière efficace l'oxydation des bases d'ADN, ce qui est particulièrement important dans le cas de l'ADN mitochondrial, où ce dommage n'est pas facilement réparable (Bentinger et al, 2007).

En résumé, QH_2 a une action antioxydante sur les lipides, les protéines membranaires et potentiellement sur l'ADN. L'efficacité de QH_2 comme antioxydant provient du fait que ce composé interfère avec la peroxydation lipidique tant dans l'initiation que dans les étapes de propagation, contrairement à l'effet de la vitamine E, qui inhibe seulement la propagation de cette peroxydation.

1.6. Autres fonctions proposées du coenzyme Q

En plus de son rôle connu en tant que transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale et d'antioxydant, plusieurs autres fonctions importantes du coenzyme Q requises pour les processus métaboliques normaux ont été récemment décrites:

1. La membrane plasmique de la plupart des cellules contient une NADH-oxydase CoQ-dépendante qui régule le rapport cytosolique $NAD^+/NADH$ et la réduction de l'ascorbate. Cette enzyme est impliquée dans la régulation de la croissance et la différenciation cellulaire (Gomez-Diaz et al, 1997) et réduit donc Q au cours de son cycle catalytique.
2. L'ouverture des pores de transitions membranaires mitochondriaux permet la translocation de molécules de taille plus grande que 1500 Da, qui conduit à un effondrement des fonctions mitochondriales et peut initier l'apoptose. Le Coenzyme Q_{10} est l'un des composés qui empêchent l'ouverture de ces pores. De ce fait, il intervient contre les événements apoptotiques comme la déplétion en ATP, la libération du cytochrome c dans le cytosol, la

dépolarisation de la membrane mitochondriale et la fragmentation de l'ADN (Papucci et al, 2003).

3. Les protéines découplantes présentes dans la membrane interne mitochondriale peuvent dissiper le gradient des protons de l'extérieur vers l'intérieur de cette membrane. Comme résultat, le gradient de protons formé par la chaîne respiratoire est découplé de la phosphorylation oxydative et de la chaleur est produite en conséquence. Ces protons sont livrés à partir des acides gras aux protéines découplantes avec l'assistance de la forme oxydée du coenzyme Q, qui est un cofacteur essentiel intervenant dans ce processus (Echtay et al, 2001).

4. Le coenzyme Q exerce de multiples effets anti-inflammatoires en influençant l'expression de gènes dépendants du NFkB1 (Schmelzer et al, 2007).

5. Le coenzyme Q contribue aussi à lutter contre le dysfonction endothéliale en stimulant la libération endothéliale de l'oxyde nitrique (Hamilton et al, 2007).

II. Biosynthèse du Coenzyme Q chez *Saccharomyces cerevisiae*

La biosynthèse du coenzyme Q chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est un processus mitochondrial qui nécessite l'implication d'au moins 9 protéines nommées de Coq1 à Coq9. La figure 10 représente le schéma de la voie de biosynthèse du coenzyme Q chez *E. coli*, *S. cerevisiae* et *Homo sapiens*. La voie de biosynthèse commence par la conjugaison de l'acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB) avec la chaîne polyisoprényle-pyrophosphate, synthétisée par la polyprényle-diphosphate-synthase Coq1, pour former l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque (HHB). Cette réaction est catalysée par Coq2, la polyprényl-diphosphate-4-HB-transférase. La voie de biosynthèse comprend ensuite plusieurs modifications du noyau aromatique, au total 3 réactions de méthylation, 3 réactions d'hydroxylation et une réaction de décarboxylation.

Pour le moment, neuf groupes de complémentation de mutants de levure déficients en coenzyme Q (*COQ1* à *COQ9*) ont été identifiés par le groupe du Prof. Alexander Tzagoloff. Ces mutants de levure *coq* ne synthétisent plus de coenzyme Q. Ils sont aussi incapables, suite au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, de croître sur des sources de carbone non

fermentable comme l'éthanol ou le glycérol et sont 'petites' c.à.d. les colonies sont plus petites que celles des cellules de type sauvage lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu contenant 0.2% de glucose (Tzagoloff & Dieckmann, 1990). Un des traits caractéristiques de ces mutants est le rétablissement des activités NADH-cytochrome c-oxydoréductase et succinate-cytochrome c-oxydoréductase dans les mitochondries isolées des mutants *coq* après l'ajout de coenzyme Q₂ exogène (Tzagoloff et al, 1976). Les homologues des gènes COQ de la levure chez les mammifères ont été identifiés soit par homologie de séquence ou par complémentation fonctionnelle. Les homologues humains des protéines Coq2, Coq3 et Coq7 complètent les phénotypes des mutants de délétion correspondantes chez la levure (Tran & Clarke, 2007). Ceci suggère que la voie de biosynthèse du coenzyme Q de la levure est conservée chez les humains.

Il semble que l'ordre des réactions de modification du noyau benzénique de HHB soit conservé entre la levure et les humains. Par contre l'étape de décarboxylation (conversion du composé 1 en composé 8 sur la figure 10) se fait avant l'hydroxylation en C5 (conversion du composé 8 en composé 9 sur la figure 10) chez *E. coli*. (figure 10)

Il est aussi important de signaler que toutes les protéines Coq sont essentielles à la biosynthèse du coenzyme Q et par suite l'absence de n'importe quelle protéine Coq entraîne un défaut de biosynthèse du coenzyme Q.

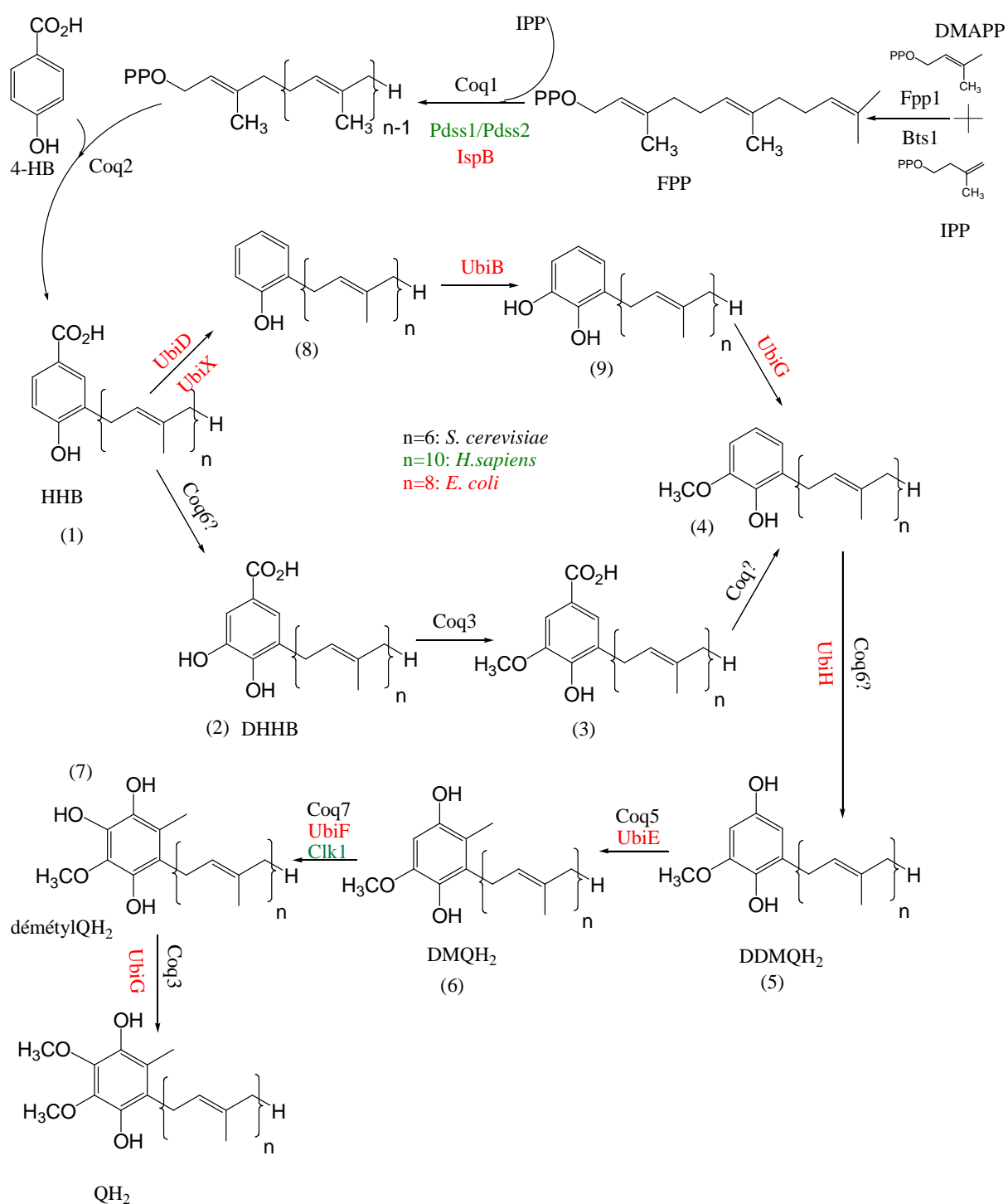


Figure 10: Schéma de la voie de biosynthèse du coenzyme Q chez *S. cerevisiae*, *H. sapiens* et *E. coli*. Les protéines de levures sont marquées en noir et celles d'*E. coli* en rouge. Pdss1/Pdss2 et Clk1 sont les équivalents humains de Coq1 et de Coq7 respectivement. Fpp1: farnésyl-pyrophosphate-synthase ; Bts1: géranylgéranyl-diphosphate-synthase ; IPP: isopentényl diphosphate ; DMAPP: diméthylallyl diphosphate ; FPP:

farnésyl diphosphate; 4-HB: acide 4-hydroxybenzoïque; HHB: acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque; DHHB: acide 3-hexaprényl-4,5-dihydroxybenzoïque; DDMQH₂: diméthyl-déméthoxyubiquinol; DMQH₂: diméthoxyubiquinol; diméthylQH₂: diméthyl-ubiquinol; QH₂: ubiquinol.

II.1. Le 4-HB est le précurseur du noyau benzénique du coenzyme Q et des analogues de 4-HB peuvent être prényler par Coq2

L'acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB) est le seul précurseur connu, depuis longtemps, du noyau benzénique du coenzyme Q (Olson et al, 1963; Rudney & Parson, 1963) (figure 11).

Des anciennes expériences *in vitro* ont permis de montrer que les homologues de Coq2 de *S. cerevisiae*, UbiA d'*E. Coli* et Coq2 du *Rattus norvegicus*, arrivent à prényler l'acide para-aminobenzoïque (pABA) (Alam et al, 1975; Hamilton & Cox, 1971). Le pABA est un composé qui présente une similitude avec le 4-HB, la seule différence étant l'existence d'un groupement amine (NH₂) dans le pABA (figure 12) qui remplace le groupement hydroxyle (OH) de 4-HB. Le pABA est largement connu comme étant un inhibiteur de la voie de biosynthèse du coenzyme Q chez *E. Coli* et chez les mammifères (Brea-Calvo et al, 2006). Ceci est dû à la diminution de la synthèse du coenzyme Q chez ces organismes en présence du pABA et à la formation de l'acide 3-polyprényle-4-aminobenzoïque (équivalent aminé du HHB) (*in vitro*). Le 4-HB et le pABA dérivent principalement de la voie du shikimate via le chorismate chez les bactéries et *S. cerevisiae*. Les enzymes responsables de la synthèse du pABA sont connues chez ces deux organismes par contre l'enzyme responsable de la synthèse de 4-HB chez *S. cerevisiae* n'est pas encore identifiée (figure 11).

D'autres études de marquage faites par Nambudiri et ses collaborateurs en 1977 ont montré que l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (3,4-diHB) et l'acide vanillique (figure 12) sont efficacement prénylés par Coq2 et que 3,4-diHB peut-être transformé en coenzyme Q dans un test *in vitro* (Nambudiri et al, 1977). Ceci renforce l'idée du manque de spécificité de cette protéine. L'ensemble des expériences avec des analogues de 4-HB ont permis d'établir les caractéristiques structurales nécessaires à la prénylation par Coq2: la présence d'un groupement donneur d'électrons en position 4 du cycle aromatique (hydroxyle (OH), amine (NH₂) ou

méthoxyle (CH_3O) combiné avec un acide carboxylique (COOH), un fort groupement électro-attracteur, en position 1 (figure 12) (Alam et al, 1975).

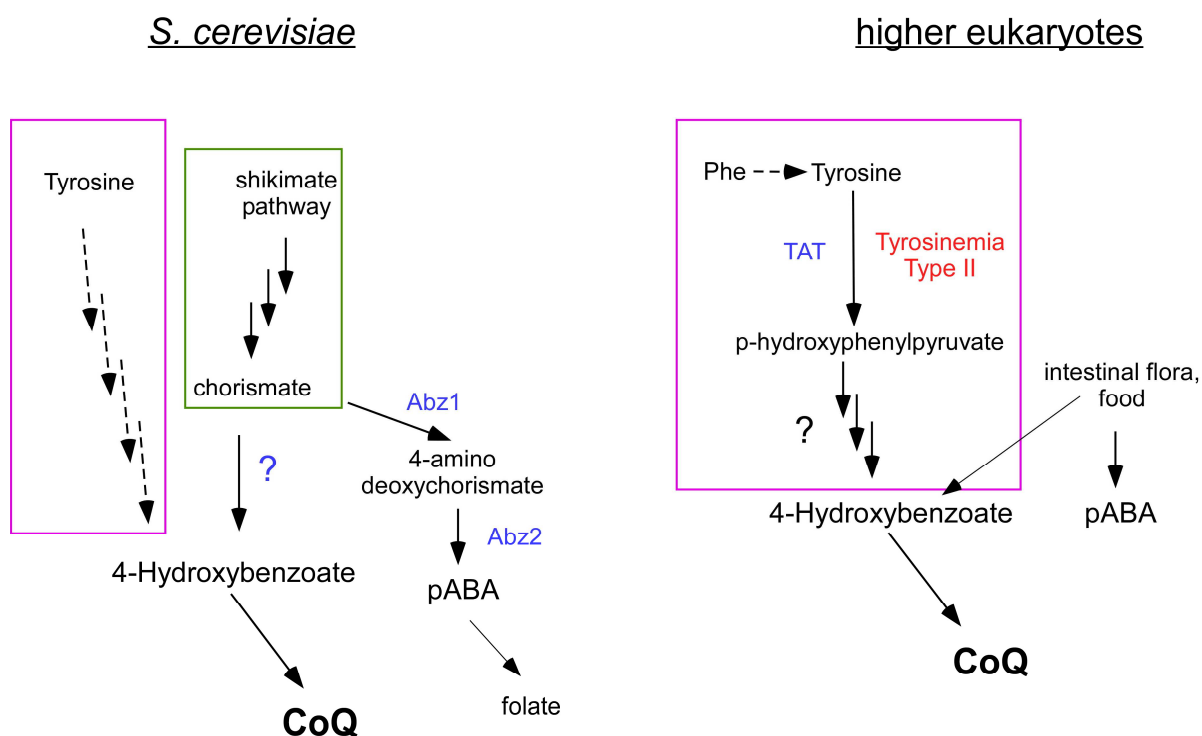


Figure 11: La voie de biosynthèse du pABA et de 4-HB montrant les différents enzymes impliquées. Les protéines non encore identifiées sont marquées par ?.

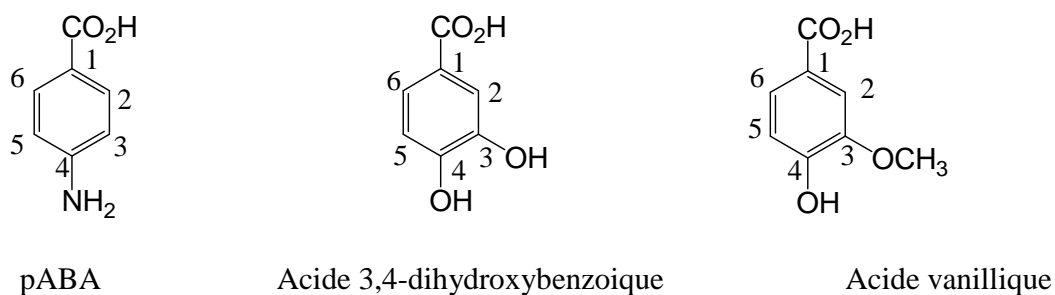


Figure 12: Les structures de différents composés prénylés par Coq2 de *S. cerevisiae*.

II.2. Etapes de biosynthèse du coenzyme Q

II.2.a. Synthèse et attachement de la chaîne polyisoprényle

II.2.a .I. Synthèse de la chaîne polyisoprényle

La formation de la queue polyisoprényle chez *S. cerevisiae* est catalysée par la polyisoprényle-diphosphate-synthase, Coq1 à partir d'isopentényl diphosphate (IPP) et de farnésyl diphosphate (FPP) (figure 10). Cette enzyme détermine la longueur de la queue polyisoprényle spécifique aux espèces. Les séquences d'acides aminés de la protéine Coq1 et des isoprényle-diphosphate-synthases d'autres eucaryotes contiennent sept motifs différents hautement conservés. Ces sept motifs, riches en résidus aspartate, sont cruciaux pour l'activité catalytique de l'enzyme. Les isoprényle-diphosphate-synthases de *S. pombe*, du rat et des humains sont des hétérotétramères de deux sous-unités protéiques, Pdss1 et Pdss2, tandis que Coq1 de *S. cerevisiae* et de la plante *Arabidopsis thaliana* sont des homo-oligomères (figure 10).

D'une manière intéressante, l'expression des homologues de Coq1 provenant d'une variété d'organismes (*S. pombe*, le rat et les humains) rétablit la biosynthèse du coenzyme Q et la respiration chez le mutant $\Delta coq1$ de *S. cerevisiae*. Ce rétablissement de la respiration provient de la production d'isoformes du coenzyme Q qui possèdent un nombre distinct d'unités d'isoprène: 9 unités avec les protéines de *S. pombe* et du rat et 10 unités avec la protéine humaine (Okada et al, 1998). Ce résultat montre que la longueur de la chaîne polyisoprényle semble peu influencer la fonction de Q au niveau de la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae*.

Des études de fractionnement submitochondrial ont démontré que Coq1 de *S. cerevisiae* est une protéine matricielle périphérique associée à la membrane interne mitochondriale (Gin & Clarke, 2005).

II.2.a.II. Attachement de la chaîne polyisoprényle

La polyprényle-diphosphate-4-HB-transférase est une enzyme qui catalyse l'attachement de la queue polyisoprényle au 4-HB, le précurseur connu du coenzyme Q, pour former le HHB

(composé numéro 1 sur la figure 10). Dans les cas de *S. cerevisiae* et *H. sapiens*, le gène codant pour cette enzyme est appelé COQ2.

Des analyses *in vitro* sur des mitochondries isolées de foie d'un rat ont démontré que l'activité polyprényltransférase est principalement présente dans les mitochondries (Momose & Rudney, 1972). Par ailleurs, les polyprényltransférases impliquées dans la biosynthèse du coenzyme Q montrent un manque de spécificité pour la longueur de la chaîne polyisoprényle (Ashby et al, 1992; Gin & Clarke, 2005; Meganathan, 2001; Okada et al, 1998; Okada et al, 2004). Cependant, il a été montré que cette spécificité est influencée par la concentration de Mg^{2+} dans les extraits de levures (Ashby et al, 1992).

L'analyse de la séquence d'acides aminés de Coq2 de *S. cerevisiae* a révélé l'existence des deux domaines conservés, riche en aspartate, impliqués dans la fixation de la queue polyisoprényle et qui sont retrouvés dans la famille des polyprényltransférases. De plus, Coq2 comporte six segments transmembranaires et une séquence d'adressage mitochondriale (Ashby et al, 1992). Coq2 se comporte donc comme une protéine membranaire associée à la membrane interne mitochondriale du côté matriciel et c'est la seule protéine Coq de levure qui possède un domaine transmembranaire (Ashby et al, 1992).

II.2.b. Réactions de méthylation

Trois réactions de méthylation se font au cours de la biosynthèse du coenzyme Q: 2 réactions d'O-méthylation catalysées par Coq3 et une réaction de C-méthylation catalysée par Coq5.

II.2.b.I. O-Méthylation

Le gène COQ3 a été initialement identifié chez *S. cerevisiae* (Clarke et al, 1991). Les homologues du gène COQ3 chez le rat, *A. thaliana* et chez les humains ont été ensuite isolés par des tests de complémentation fonctionnelle sur des mutants $\Delta coq3$ de levure (Avelange-Macherel & Joyard, 1998; Jonassen & Clarke, 2000; Marbois et al, 1994). Les séquences d'acides aminés des protéines codées par ces homologues de COQ3 contiennent toutes quatre

régions qui sont conservées dans une grande famille d'enzymes de type méthyltransférase utilisant la S-adénosylméthionine (SAM ou AdoMet) comme donneur de méthyle (Kagan & Clarke, 1994; Katz et al, 2003; Niewmierzycka & Clarke, 1999) et qui ont besoin d'un cation divalent pour leur activité (Jonassen & Clarke, 2000; Turunen et al, 2004).

Des essais *in vitro* avec des analogues farnésylés synthétiques, l'acide 3-polyprényl-4,5-dihydroxybenzoïque et la déméthylQ₃H₂, (composés A et C avec n=3 sur la figure 13) ont montré que deux étapes d'O-méthylation dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q sont catalysées par la même enzyme codée par le gène COQ3 (Poon et al, 1999).

Comme la plupart des protéines Coq, la protéine Coq3 de *S. cerevisiae* contient une séquence d'adressage mitochondriale à l'extrémité N-terminale. Des expériences d'importation *in vitro* (Hsu et al, 1996) et de localisation subcellulaire (Poon et al, 1999) ont montré que l'apoprotéine Coq3 est importée puis maturée dans les mitochondries, d'une manière dépendante du potentiel de membrane. D'autres expériences de fractionnement mitochondriale ont démontré que Coq3 est une protéine périphérique associée au côté matriciel de la membrane interne mitochondriale (Poon et al, 1999).

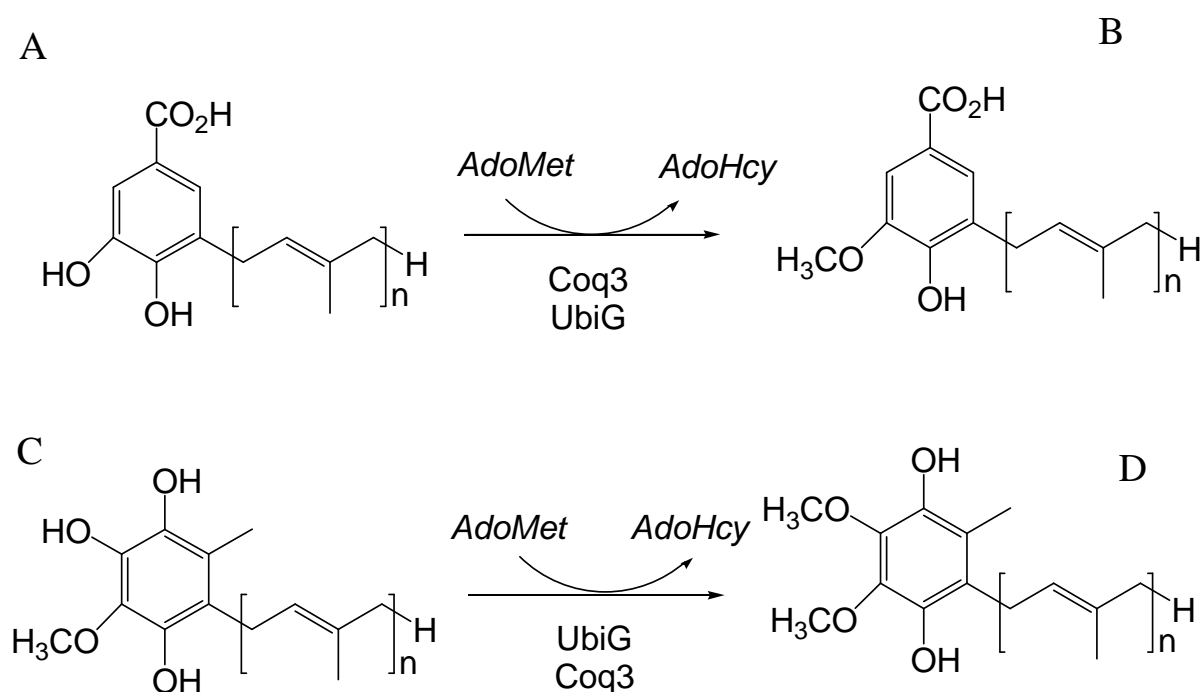


Figure 13: Les réactions d'O-méthyltransférase dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q. Chez les eucaryotes, la 1^{ère} réaction d'O-méthylation implique la protéine Coq3 pour la conversion de l'acide 3-

polyprényle-4,5-dihydroxybenzoïque (composé A) en acide 3-polyprényle-5-méthoxy-4-hydroxybenzoïque (composé B). La 2^{ème} O-méthylation nécessite aussi Coq3 pour la conversion de la déméthylQH₂ (composé C) en ubiquinol (composé D). UbiG est l'enzyme qui catalyse ces deux réactions de méthylation chez les procaryotes. AdoHcy: Adénosyl-homocystéine. AdoMet: Adénosyl-méthionine.

UbiG, l'équivalent de Coq3 chez *E. coli*, a été identifiée par homologie de séquence et cette enzyme catalyse également les deux réactions d'O-méthylation dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q chez *E. coli* (Hsu et al, 1996) (figure 13).

II.2.b.II. C-Méthylation

La seule étape de C-méthylation dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q se fait par la méthyltransférase codée chez *S. cerevisiae* par le gène COQ5 (figure 14). Le gène COQ5 a été isolé à partir d'une banque d'ADN génomique de levure sur la base de sa capacité à rétablir la respiration dans deux mutants ponctuels, *coq5-1* (Dibrov et al, 1997) et *coq5-2* (Barkovich et al, 1997). L'ORF de COQ5 comporte également les 4 motifs de liaison à la SAM mentionnés précédemment. Des tests d'activité C-méthyltransférase *in vitro*, avec l'analogue farnésylé de la DDMQ₆H₂ (substrat de Coq5) confirment que Coq5 est nécessaire pour la conversion de la déméthyl-déméthoxyubiquinol (DDMQ₆H₂) en méthoxyubiquinol (MQ₆H₂) dans la biosynthèse du coenzyme Q₆ (Baba et al, 2004; Barkovich et al, 1997).

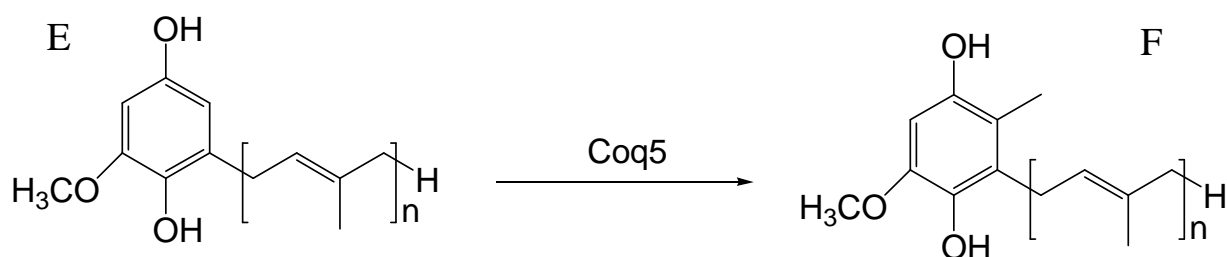


Figure 14: La réaction de C-méthyltransférase dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q.

Coq5 est la protéine impliquée dans la conversion de la déméthyl-déméthoxyquinol DDMQH₂ (E) en méthoxyubiquinol DMQH₂ (F).

D'une manière intéressante, deux mutants ponctuels *coq5-2* et *coq5-5* maintiennent des niveaux normaux des protéines Coq3, Coq4 et Coq5, tandis que les niveaux de ces protéines sont beaucoup diminués dans d'autres mutants *coq5* (Baba et al, 2004). Ces deux mutants ponctuels sont les seuls mutants *coq5* complémentés par la surexpression d'UbiE, l'homologue de Coq5 chez *E. coli* (Lee et al, 1997).

Des analyses de fractionnement mitochondriale ont démontré que Coq5 est associée à la périphérie de la membrane interne sur le côté matriciel (Baba et al, 2004).

II.2.c. Réactions d'hydroxylation

Trois réactions d'hydroxylation ont lieu au cours de la biosynthèse du coenzyme Q dont l'hydroxylation en C5 (conversion du composé 1 en composé 2 sur la figure 10) qui est la première modification du noyau aromatique du HHB. Ensuite viennent l'hydroxylation en C1 (conversion du composé 4 en composé 5 sur la figure 10) puis l'hydroxylation en C6 (conversion du composé 6 en composé 7 sur la figure 10).

II.2.c.I. Hydroxylation de la déméthoxyubiquinone

(DMQ₆): l'hydroxylation en C6

La première réaction d'hydroxylation caractérisée dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q chez *S. cerevisiae* a été l'hydroxylation de la déméthoxyubiquinol (DMQ₆H₂) qui est catalysée par Coq7 (figure 15) (Marbois & Clarke, 1996). Le gène COQ7/CAT5 de *S. cerevisiae* a été isolé et caractérisé comme étant requis pour la biosynthèse du coenzyme Q (Marbois & Clarke, 1996; Tzagoloff & Dieckmann, 1990) et aussi comme étant impliqué dans la répression/dérépression catabolique du carbone (Proft et al, 1995). La répression/dérépression catabolique est un système global qui régule la transcription de gènes de la néoglucogenèse, du métabolisme des sucres et la respiration (Gancedo, 1998). Cependant, le défaut de régulation des catabolites dans les mutants *coq7* a été plus tard démontré comme un effet secondaire de la déficience respiratoire (Jonassen et al, 1998). Cette déficience respiratoire peut être complémentée par l'ajout de coenzyme Q₆ exogène (Jonassen et al, 1998), impliquant ainsi la participation directe de Coq7 dans la biosynthèse du coenzyme Q.

D'une manière intéressante, il a été montré que le mutant ponctuel G65D de Coq7 accumule la DMQ₆, en plus du HHB alors que le mutant de délétion $\Delta coq7$ n'accumule que HHB (Marbois & Clarke, 1996). De même, un mutant $\Delta coq7$ de *S. cerevisiae* exprimant une mutation faux sens dans la protéine Coq7 (E194K) produit de la DMQ₆, tandis que la DMQ₆ n'est pas détectée dans des souches exprimant des mutations de délétion de la partie C-terminale de la protéine Coq7 (Padilla et al, 2004). Par ailleurs, l'expression des homologues de COQ7 de *C. elegans* (Ewbank et al, 1997), du rat (Jonassen et al, 1996), ou des humains (Vajo et al, 1999), complémente le phénotype des mutants $\Delta coq7$ de *S. cerevisiae*, indiquant la conservation fonctionnelle pour cette protéine entre les espèces. La fonction hydroxylase de Coq7 a été renforcée par la prédiction qu'elle appartient à la famille des hydroxylases bi-nucléaires à fer contenant un motif impliqué dans la liaison du fer, EXXH (Stenmark et al, 2001). Behan et Lippard ont montré en 2010 par des méthodes spectroscopiques (RPE et Mössbauer) que Clk1 (l'homologue de Coq7 chez le rat) est en effet une protéine à centre bi-nucléaire de fer. Les auteurs ont montré *in vitro* une activité C6-hydroxylase de Clk1 et ont proposé que le NADH pourrait directement réduire le centre bi-nucléaire de fer de cette protéine sans nécessité d'une réductase supplémentaire comme pour les mono-oxygénases à centre bi-nucléaire de fer habituelles.

La surexpression des homologues de Coq7 de *Pseudomonas aeruginosa*, *Thiobacillus ferrooxidans* et de *C. elegans* rétablit la biosynthèse du coenzyme Q dans un mutant correspondant d'*E.coli*, le mutant *ubiF* (Adachi et al, 2003; Stenmark et al, 2001). UbiF est une mono-oxygénase à flavine qui peut compléter le phénotype de déficience respiratoire des mutants *coq7* (ponctuels ou de délétion) malgré le fait qu'elle n'utilise pas le même cofacteur (Tran et al, 2006).

Des études récentes de fractionnement submitochondrial (Tran & Clarke, 2007) montrent que la protéine Coq7 de *S. cerevisiae*, comme son homologue chez le rat (Jiang et al, 2001), est associée à la périphérie de la membrane interne sur le côté matriciel.

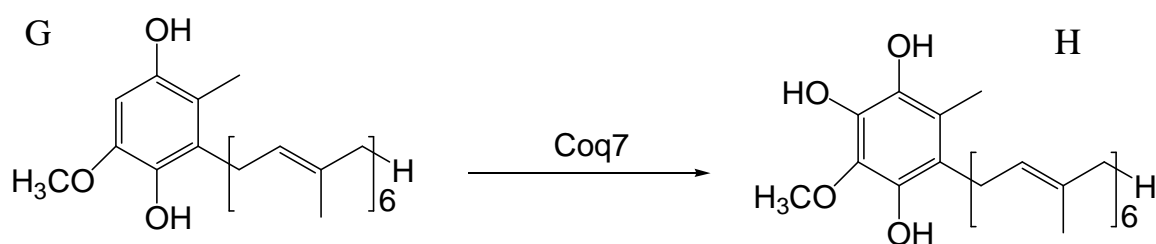


Figure 15: La réaction d'hydroxylation de la DMQ₆H₂ catalysée par Coq7. Coq7 est la protéine impliquée dans la conversion de la déméthoxyubiquinone DMQ₆H₂ (G) en déméthylQ₆H₂ (H).

II.2.c.II. Les 2 autres réactions d'hydroxylation

Le gène COQ6 de *S. cerevisiae* a été identifié (Gin et al, 2003) par des expériences de complémentation fonctionnelle d'un mutant du groupe de complémentation G63 (*coq6-1*) du groupe du Prof. Tzagoloff (Tzagoloff & Dieckmann, 1990). Contrairement à ce qui était publié par Fiori et ses collaborateurs en 2000, le gène COQ6 a été montré comme un gène non-essentiel pour la viabilité, mais nécessaire pour la respiration (croissance sur une source de carbone non-fermentable) (Gin et al, 2003).

La protéine Coq6 est une protéine mitochondriale qui est importée d'une manière dépendante du potentiel de membrane et périphériquement associée au côté matriciel de la membrane interne (Gin et al, 2003). Coq6 de *S. cerevisiae* et ses homologues de *H. sapiens*, du *R. norvegicus* et de *C. elegans* contiennent trois régions conservées qui caractérisent la famille des hydroxylases à flavine (Gin et al, 2003; Palfey et al, 1994): une empreinte de liaison à l'ADP, (Wierenga et al, 1986), un motif avec une fonction de liaison au FAD et au NAD(P)H (Eppink et al, 1997) et une séquence consensus qui lie le groupement ribityl du FAD (Eggink et al, 1990) (figure 16).

Par conséquent, Coq6 a été considérée comme étant une oxygénase à flavine responsable de l'ajout du groupement hydroxyle au HHB (composé numéro 1 sur la figure 10) et/ou au 3-polyprényle-4-hydroxy-5-méthoxybenzène (composé numéro 4 sur la figure 10), les deux étapes d'hydroxylations non caractérisées dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q.

Cette ambiguïté autour du rôle de Coq6 vient du fait que le mutant $\Delta coq6$ accumule du HHB comme la plupart des mutants Δcoq (voir II.2.g.I) et qu'aucune étude biochimique de Coq6 n'a été menée.

La détermination de la fonction moléculaire de Coq6 fera l'objet du premier chapitre de cette thèse.

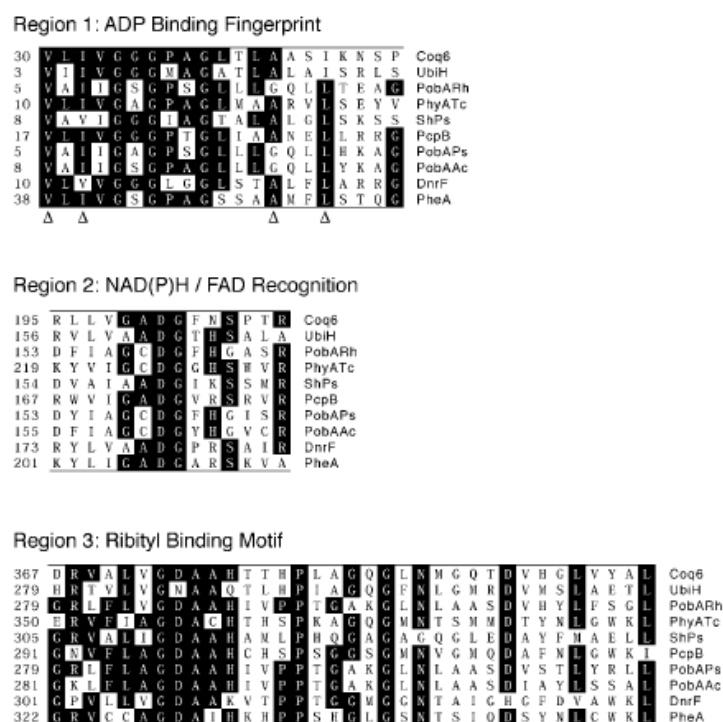


Figure 16: Alignement de séquences des différentes oxygénases à flavine présentes chez différents organismes. Le symbole Δ représente les acides aminés Ala, Ile, Leu, Val, Met qui sont impliqués dans la liaison à l'ADP dans la région 1. La région 2 est impliquée dans la reconnaissance du NADH ou NAD(P)H et également impliquée indirectement dans la liaison du fragment pyrophosphate du FAD (Eppink et al, 1997). La région 3 contient une séquence consensus impliquée dans la liaison à la fraction ribityle du FAD (Eggink et al, 1990). Les hydroxylases aromatiques sont désignées comme UbiH, la 2-octaprényl-6-hydroxylase méthoxyphénol d'*E. coli*; PobARh, la 4-hydroxybenzoate-hydroxylase (PobA) du *Rhizobium leguminosarum*; PhyATc, l'hydroxylase-phénol de *Trichosporon cutaneum*; ShPs, la salicylate-hydroxylase de *Pseudomonas putida*; PcpB, la pentachlorophénol-4-monooxygénase de *Flavobacterium sp.*; PobAPS, la p-hydroxybenzoate-hydroxylase de *Pseudomonas fluorescens*; PobAAc, la p-hydroxybenzoate-hydroxylase de *Acinetobacter calcoaceticus*; DnrF, la 11-hydroxylase de *Streptomyces aklavinone peucetius* et PheA, la monooxygénase-phénol de *Pseudomonas sp* (D'après (Gin et al, 2003)).

II.2.d. Coq8

Le gène COQ8 a été initialement identifié comme ABC1 (activateur du complexe bc1) pour sa capacité à supprimer partiellement, en multi-copie, le défaut de traduction du cytochrome b qui est dû à la mutation *chs2-223* dans le gène CBS2 (Bousquet et al, 1991). CBS2 est un gène de *S. cerevisiae* codant pour un activateur traductionnel du cytochrome b qui interagit avec les ribosomes pendant la traduction (Rodel, 1986). Il a été observé que l'inactivation de ABC1 abouti à un défaut respiratoire et à une absence d'activité NADH-cytochrome c-oxydoréductase (Bousquet et al, 1991), un phénotype similaire à celui des souches déficientes en coenzyme Q (Tzagoloff & Dieckmann, 1990). Do et coll. ont démontré en 2001 que la déficience en coenzyme Q est exclusivement responsable des défauts pléiotropiques des mutants *abc1* et ont donc renommé COQ8 le gène ABC1 (Do et al, 2001). Par ailleurs, Hsieh et coll. en 2004 ont montré que le gène *ARNt^{TRP}* situé en aval du gène COQ8/ABC1, est responsable de la complémentation du phénotype du mutant *chs2-223* (Hsieh et al, 2004). Bien que sa fonction biochimique dans la biosynthèse du coenzyme Q soit actuellement inconnue, la protéine Coq8/Abc1 a été classée comme une protéine kinase atypique sur la base de l'identification de quatre motifs kinases conservés dans sa séquence d'acides aminés (Leonard et al, 1998).

En 2008, Tauche et coll., ont montré que Coq8 forme un homomère et se comporte comme une protéine soluble de la matrice mitochondriale qui pourrait être associée à la périphérie de la membrane interne mitochondriale (Tauche et al, 2008). Ils ont aussi proposé un rôle de Coq8 dans la phosphorylation de Coq3 puisqu'en absence de Coq8, aucune forme phosphorylée de Coq3 n'est détectable. De plus, la délétion de COQ8 conduit à une déstabilisation de l'association de Coq3 avec le complexe protéique (Tauche et al, 2008).

En 2009, Padilla et coll., ont montré que la surexpression de Coq8 dans un mutant $\Delta coq7$ entraîne l'accumulation de la DMQ₆ (Padilla et al, 2009). L'accumulation de la DMQ₆ dans le mutant $\Delta coq7$ /Coq8 laisse entendre que les protéines en amont de Coq7 sont stables et actives. Les conséquences de la surexpression de Coq8 dans les mutants Δcoq feront l'objet du deuxième chapitre de ma thèse.

II.2.e. Protéines de fonction inconnue

Comme le gène codant pour la protéine Coq3, le gène COQ4 a été cloné par complémentation fonctionnelle d'un mutant déficient en coenzyme Q, le mutant ponctuel E266K (*coq4-1*) (Belogradov et al, 2001). La croissance sur une source de carbone non fermentable (qui nécessite la respiration) provoque une augmentation du taux d'ARNm du COQ4 ce qui est compatible avec son rôle dans la biosynthèse du coenzyme Q.

Cependant, la fonction de Coq4, une protéine périphérique associée à la membrane interne mitochondriale sur le côté matriciel (Belogradov et al, 2001), reste un mystère. Bien qu'il soit attrayant de spéculer que Coq4 pourrait catalyser une des étapes de biosynthèse du coenzyme Q pour lesquelles aucune protéine n'a été identifiée (désigné "Coq?" sur la figure 10), la séquence d'acides aminés de Coq4 ne montre pas d'homologie significative avec des domaines connus ou avec des motifs de protéines qui présentent des activités enzymatiques connues. Un nouveau rôle structural pour Coq4 a été proposé récemment par Rea et coll. en 2010. Ils ont suggéré que Coq4 peut lier la queue polyisoprényle des intermédiaires de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ permettant ainsi la modification du noyau aromatique par les autres protéines Coq (Rea et al, 2010).

Le gène COQ9 a été identifié en 2005 et caractérisé comme un nouveau gène qui, lorsqu'il est muté, montre un phénotype similaire aux autres mutants déficients en coenzyme Q (absence du coenzyme Q, défaut de croissance sur milieu respiratoire...) (Johnson et al, 2005). Cependant, la fonction de Coq9 n'est pas encore connue. La séquence d'acides aminés de la protéine contient un domaine distinct conservé présent dans la famille des protéines COG5590 (protéines de fonction inconnues) (Marchler-Bauer et al, 2005). Bien que les homologues de COQ9 soient bien représentés dans les génomes des eucaryotes et des α -protéobactéries, Coq9 ne montre pas d'homologie avec des protéines ayant une fonction connue. Récemment, l'analyse de la localisation submitochondriale a démontré que la protéine Coq9 est une protéine associée au côté matriciel de la membrane interne mitochondriale (Hsieh et al, 2007).

II.2.f. Coq10 : Une nouvelle protéine de liaison du coenzyme Q

La complémentation d'une déficience respiratoire partielle d'un mutant issue d'une collection de délétion du génome de *S. cerevisiae* a permis l'identification de COQ10, comme étant un nouveau gène requis pour la fonction respiratoire de Q (Barros et al, 2005). Comme les autres mutants Δcoq (*coq1-coq9*), le mutant $\Delta coq10$ de *S. cerevisiae* présente un défaut dans l'activité NADH-cytochrome c-oxydoréductase et succinate-cytochrome c-oxydoréductase. Ce défaut peut être rétabli à un niveau WT par addition du coenzyme Q₂ exogène. Malgré un niveau de coenzyme Q comparable à une souche WT, le mutant $\Delta coq10$ montre une croissance modérée sur milieu respiratoire contenant des sources de carbone non fermentables (éthanol et glycérol) qui est complètement rétabli par supplémentation du milieu en coenzyme Q₆ exogène ou par la surexpression des gènes COQ2, COQ7, ou COQ8. Ceci indique que le coenzyme Q₆ synthétisé par le mutant $\Delta coq10$ est beaucoup moins fonctionnel que celui produit dans la souche WT.

L'analyse des séquences protéiques de Coq10 de *S. cerevisiae*, ainsi que ses homologues chez *Caulobacter crescentus* et chez d'autres eucaryotes, a identifiée Coq10 comme étant un membre de la superfamille des protéines contenant le domaine START. Le domaine START, toujours situé à l'extrémité C-terminale des protéines, est un module d'environ 210 résidus qui lie les lipides, y compris les stérols (Shen et al, 2005). Une étude structurale de l'homologue de Coq10 chez *C. crescentus* a identifié un tunnel hydrophobe qui est connu pour lier le cholestérol, les polykétides, ou des phospholipides (Miller, 2007). Comme Coq10 fait partie des polypeptides appartenant à la superfamille des protéines impliquées dans la liaison des lipides et leur acheminement, il est donc très probable que la protéine Coq10 peut aussi fonctionner dans le transport ou l'adressage du coenzyme Q nouvellement synthétisé à son emplacement correct dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Tran & Clarke, 2007).

II.2.g. Le complexe protéique de la voie de biosynthèse du coenzyme Q chez S. cerevisiae

La chaîne respiratoire mitochondriale de *S. cerevisiae* est composée de plusieurs complexes multiprotéiques. Beaucoup de ces complexes mitochondriaux respiratoires ont été bien caractérisés chez la levure *S. cerevisiae*, par exemple, la cytochrome c-oxydase, l'ATP synthase et le complexe bc1. Dans ces systèmes, l'absence ou la mutation d'un seul composant entraîne la dégradation protéolytique, ou l'inactivation des autres sous-unités (Glerum & Tzagoloff, 1997). Cela semble être aussi le cas dans la biosynthèse du coenzyme Q. Des études antérieures ont fourni de nombreuses preuves génétiques de l'existence d'un complexe de biosynthèse de Q et beaucoup d'études biochimiques (immunoprécipitation, filtration sur gel...) montrent que plusieurs protéines Coq appartiennent à une même structure macromoléculaire.

II.2.g.I. Les mutants Δcoq accumulent le HHB

Les mutants de délétion des gènes codants pour les protéines allant de Coq3 à Coq9 accumulent principalement le même intermédiaire, le HHB, le produit de Coq2 (composé 1 sur la figure 10), au lieu des intermédiaires correspondants dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q (Johnson et al, 2005; Poon et al, 1997; Poon et al, 1995). Ceci s'explique par le fait que la stabilité des protéines Coq4, Coq6, Coq7 et Coq9 est significativement diminuée dans les mitochondries isolées de mutants Δcoq (Baba et al, 2004; Belogradov et al, 2001; Gin & Clarke, 2005; Hsieh et al, 2007; Hsu et al, 2000; Tran et al, 2006). Ainsi, la stabilité de ces protéines Coq dépend de la présence des autres protéines Coq.

Coq3 avait été préalablement décrite comme étant dépendante de la présence des autres protéines Coq pour sa stabilité (Hsu et al, 2000), cependant, Tauche et coll. ont montré que la protéine Coq3 est stable dans tous les mutants Δcoq , quand les mitochondries sont isolées en présence d'inhibiteurs de protéases (Tauche et al, 2008).

*II.2.g.II. Complémentation des mutants ponctuels *coq* par leurs homologues*

Il a été démontré que les phénotypes de certains mutants ponctuels *coq* sont différents des mutants de délétions correspondants. Par exemple, la surexpression d'UbiF d'*E. coli* rétablit la biosynthèse du coenzyme Q dans le mutant ponctuel *coq7* (E194K), mais pas dans le mutant $\Delta coq7$ (Tran et al, 2006). D'une manière similaire, la biosynthèse du coenzyme Q est rétablie dans les mutants ponctuels *coq5-2* et *coq5-5* (dans lesquels les niveaux protéiques de Coq3, Coq4 et Coq5 sont normaux) par la surexpression d'UbiE (l'homologue du Coq5) d'*E. coli* (Baba et al, 2004). Ce n'est pas le cas dans un mutant $\Delta coq5$. Par ailleurs, les protéines Coq3 et Coq7 sont stables dans le mutant ponctuel *coq4-1* (E226K), tandis qu'elles sont dégradées dans le mutant $\Delta coq4$ (Belogradov et al, 2001).

D'une manière intéressante, l'ajout du coenzyme Q₆ exogène entraîne la stabilisation des niveaux protéiques de Coq3 et Coq4 dans le mutant $\Delta coq7$ (Tran et al, 2006).

Ces résultats démontrent que la présence d'une protéine Coq inactive n'est pas équivalent à l'absence de cette protéine causée par la délétion du gène et suggère que le coenzyme Q lui-même, pourrait jouer un rôle dans la stabilité de certaines protéines Coq.

II.2.g.III. Preuves biochimiques de l'existence du complexe

Des analyses biochimiques récentes ont donné des preuves de l'existence d'un complexe de biosynthèse du coenzyme Q. Une filtration sur gel couplée à un dosage de l'activité O-méthyltransférase de Coq3 d'un surnageant provenant des mitochondries solubilisées par la digitonine ont montré que les protéines Coq3, Coq4, Coq6 et Coq7 co-éluent comme un complexe protéique de haut poids moléculaire (Marbois et al, 2005; Tran et al, 2006). Une analyse plus poussée couplée avec la spectrométrie de masse a indiqué que la DMQ₆, le substrat de Coq7, est également associée avec le complexe (Marbois et al, 2005). Récemment, une filtration sur gel réalisée avec des anticorps spécifiques nouvellement générés a montré que la protéine Coq2 co-élue avec Coq4 et Coq7 et que Coq9 co-élue avec Coq3, Coq4, Coq5 et Coq8 (Tran & Clarke, 2007). En outre, une analyse du surnageant des mitochondries solubilisées à la

digitonine sur un gel d'électrophorèse bleu natif 2D (BN-PAGE/SDS-PAGE) indique que Coq2, Coq3, Coq4, Coq7 et Coq9 co-migrent dans un complexe de haut poids moléculaire (>669kDa) (Hsieh et al, 2007; Tran et al, 2006). Une expérience de Co-précipitation de la protéine Coq3 biotinyllée avec Coq4 a permis d'identifier une interaction physique entre ces deux protéines (Marbois et al, 2005). En outre, la fusion de la protéine Coq9 au HA (antigène hémagglutinine) a permis récemment de démontrer, par co-immunoprécipitation, une interaction physique de Coq9 avec les protéines Coq4, Coq5, Coq6, et Coq7.

L'ensemble de ces résultats confirment l'existence d'un complexe multi-sous-unités de biosynthèse du coenzyme Q_6 constitué des protéines Coq. De plus, ce complexe pourrait impliquer des intermédiaires de la voie de biosynthèse du coenzyme Q_6 comme la DMQ_6 .

Un modèle proposé par la Prof. Catherine Clarke pour le complexe de biosynthèse du coenzyme Q_6 dans lequel Coq2 sert d'ancrage à la membrane mitochondriale interne est représenté dans la figure 17. Dans cette figure, les composants protéiques du complexe sont modélisés en association avec Coq2. Cependant, le complexe pourrait aussi être ancré à la membrane et stabilisé par l'intermédiaire d'autres protéines non caractérisées et/ou des composants lipidiques comme la DMQ_6 . Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer la stœchiométrie des composants protéiques et des lipides du complexe, pour élucider la nature des associations à la membrane et pour identifier d'autres constituants potentiels...

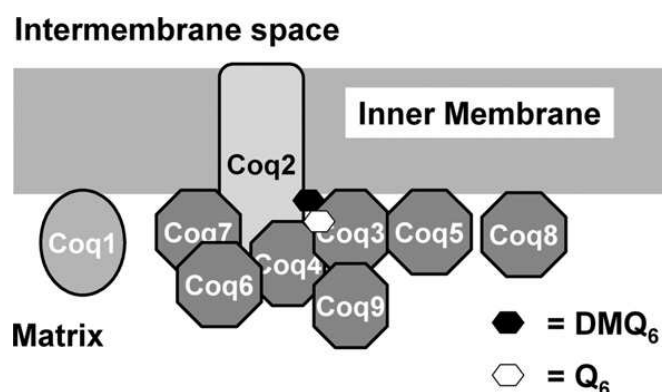


Figure 17: Un modèle du complexe protéique mitochondrial impliqué dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q_6 chez *S. cerevisiae*. Le complexe contient six protéines Coq (Coq3-7 et Coq9) qui sont périphériquement associées à la membrane interne mitochondriale (gris foncé octogones) et la protéine transmembranaire Coq2. Les composants lipidiques proposés pour faire partie du complexe sont la DMQ_6 (hexagone noir) et le produit final Q_6 (hexagone blanc) (D'après (Tran & Clarke, 2007)).

III. Déficience en coenzyme Q

Etant des organismes qualifiés 'aérobies facultatifs', les mutants de levures déficientes en coenzyme Q montrent une croissance normale sur milieu non respiratoire contenant du glucose comme source de carbone mais du fait de l'altération de la respiration, ces mutants sont incapables de pousser sur un milieu respiratoire nécessitant la présence de coenzyme Q fonctionnel. Chez les humains, plusieurs maladies ont été associées à une carence en coenzyme Q₁₀. A cause de son rôle crucial dans la production d'énergie, les tissus qui demandent le plus d'énergie comme le rein semblent plus fortement affectés par une carence en coenzyme Q (Bhagavan & Chopra, 2005).

Cliniquement, la déficience primaire en Coenzyme Q₁₀ est une affection autosomique récessive avec un spectre clinique qui englobe au moins cinq phénotypes majeurs: 1) encéphalomyopathie, caractérisée par la triade de la myoglobinurie récurrente, l'implication du cerveau et fibres rouges déchiquetées; 2) une grave maladie infantile multisystémique; 3) ataxie cérébelleuse; 4) le syndrome de Leigh avec un retard de croissance, de l'ataxie et une surdité; 5) myopathie isolée (Quinzii & Hirano, 2010). Dans la plupart des cas, la supplémentation en coenzyme Q₁₀ améliore l'état des patients. Des mutations dans six gènes humains de la voie de biosynthèse du coenzyme Q ont été identifiées: ADCK3/CABC1, PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ9 et très récemment COQ6.

III.1. Identification des mutations et signes cliniques

III.1.a. ADCK3/CABC1; COQ8

En 1989, Ogasahara et ses collègues rapportent les premiers patients présentant un déficit en coenzyme Q₁₀. Ces deux patients présentent une myopathie mitochondriale, des taux élevés de créatine kinase sérique (CK), une myoglobinurie récurrente, de l'acidose lactique et un retard mental qui est associé à une diminution des activités NADH-cytochrome c-oxydoréductase et succinate-cytochrome c-oxydoréductase (Ogasahara et al, 1989). Plusieurs autres patients souffrant des mêmes symptômes ont montré une carence en coenzyme Q₁₀. Parmi ce groupe de patients, des anomalies génétiques ont été trouvées dans le gène ADCK3/CABC1 (R213W,

G272V, G272D et E551K) (Aure et al, 2004; Mollet et al, 2008), l'orthologue humain du gène COQ8 de *S. cerevisiae*. Un autre groupe de patients atteints de diabète juvénile et d'ataxie cérébelleuse présentent une carence en coenzyme Q₁₀ et cette carence résulte de mutations dans le gène ADCK3/CABC1 (Lagier-Tourenne et al, 2008; Mollet et al, 2008).

III.1.b. COQ2

En 2006, Quinzii et ses collaborateurs ont signalé la première mutation (faux sens) causant un déficit primaire en coenzyme Q₁₀ chez des patients montrant un désordre infantile multisystémique. Ensuite, Rotig et coll., ont rapporté une délétion de l'exon 7 du gène COQ2 chez deux patients (Mollet et al, 2007). Le désordre infantile a été décrit initialement en 2000 par Rötig et ses collaborateurs. Les patients ont présenté, juste après la naissance, des symptômes neurologiques, y compris un nystagmus, une atrophie optique, surdité neurosensorielle, ataxie, dystonie, une faiblesse, et rapidement une néphropathie progressive (Rotig et al, 2000). Deux autres patients atteints de glomérulopathie précoce résultant des mutations dans le gène COQ2 ont été aussi décrits (Diomedi-Camassei et al, 2007).

III.1.c. PDSS1/PDSS2; COQ1

Des mutations dans PDSS2 ((non sens D308E) et faux-sens), un gène codant pour une des deux sous-unité de l'orthologue humain de Coq1 de *S. cerevisiae* (figure 10), ont été signalées chez un nourrisson masculin présentant un syndrome néphrotique et le syndrome de Leigh (Lopez et al, 2006). Le garçon a présenté une pneumonie néonatale et une hypotonie.

Dans une famille consanguine, deux frères avaient une carence en coenzyme Q₁₀ due à une mutation dans le domaine conservé chez les polyprényles synthase et notamment PDSS1, un gène codant pour une des deux sous-unités de l'orthologue humain de Coq1 de *S. cerevisiae*. Ces patients présentent une maladie multisystémique avec une surdité précoce, encéphaloneuropathie, l'obésité, livedo reticularis, et valvulopathie cardiaque (Mollet et al, 2007).

III.1.d. COQ9

En 2009, Duncan et ses collègues ont rapporté une mutation non-sens (C730T) dans le gène COQ9, nécessaire à la biosynthèse du coenzyme Q₁₀, chez un garçon âgé de 6 mois qui présentait une mauvaise alimentation et de l'hypothermie, (Duncan et al, 2009; Rahman et al, 2001). Il avait une hypertonie généralisée des membres, de l'acidose lactique, une tubulopathie rénale et de la cardiomyopathie.

III.1.e. COQ6

Très récemment, Heeringa et ses collaborateurs ont identifié six mutations différentes dans COQ6 (A353D, G255R, R162X, R188X, W447X et Q461fsX478 (Q461-Frame Shift)) chez 13 patients dont quatre Libanais (Heeringa et al, 2011). Chaque mutation est liée à l'apparition précoce de la maladie Syndrome Néphrotique Résistant au Stéroïde (SRNS) avec une surdité neurosensorielle. SRNS est une cause fréquente du stade terminal d'une insuffisance rénale. Les effets délétères de ces mutations dans la protéine Coq6 humaine ont été validés par des expériences qui ont évalué l'activité de cette protéine dans le mutant $\Delta coq6$ de *S. cerevisiae*. Les auteurs ont montré que la protéine Coq6 humaine WT mais pas les formes mutées était capable de compléter le défaut respiratoire et le défaut de biosynthèse de Q₆ dans le mutant $\Delta coq6$ de *S. cerevisiae* (Heeringa et al, 2011). Par ailleurs, des knockdown de Coq6 dans des podocytes et dans des embryons de poissons zèbres ont provoqué l'apoptose qui a été partiellement annulée par l'ajout de coenzyme Q₁₀ exogène (Heeringa et al, 2011).

Il est important de noter que tous les patients qui montrent des mutations dans PDSS1, PDSS2, COQ2, COQ9 ou COQ6 avaient une maladie rénale (Diomedi-Camassei et al, 2007; Duncan et al, 2009; Lopez et al, 2006; Mollet et al, 2007; Quinzii et al, 2007) comme le cas d'un mutant *pdss2* (mutation faux sens) du rat qui montre une glomérulonéphrite. Cette dernière étant le seul signe clinique (Peng et al, 2008).

IV. Les sources d'électrons des oxygénases de la voie de biosynthèse du coenzyme Q

IV.1. Réductions des oxygénases

Les mono-oxygénases sont des protéines largement distribuées qui catalysent l'incorporation d'un atome d'oxygène dans les substrats. Le dioxygène est la source de l'atome d'oxygène, et les mono-oxygénases utilisent généralement un métal de transition (par exemple, le fer ou le cuivre) ou un cofacteur organique (par exemple, la flavine ou ptérine) pour réaliser l'activation du dioxygène dans leurs sites actifs. Cette activation nécessite deux électrons, qui sont fournis par un agent réducteur. Le NAD(P)H est le réducteur du cofacteur flavine des mono-oxygénases flavoprotéines, alors que la réduction des autres oxygénases, comme la réduction du fer hémique du cytochrome P450, est accomplie par une réductase associée (Ballou et al, 2005; Munro et al, 2007).

IV.2. Les oxygénases de la voie de biosynthèse du coenzyme Q

Coq6 et Coq7 sont les deux oxygénases connues dans la biosynthèse du coenzyme Q. Coq7 hydroxyle la DMQ₆ (Padilla et al, 2004; Tran et al, 2006), et Coq6 est proposée pour catalyser l'une ou l'autre ou les deux étapes d'hydroxylation restantes (Gin et al, 2003). Les motifs conservés dans les séquences primaires de Coq6 et Coq7 prédisent que ces deux mono-oxygénases utilisent comme cofacteurs une flavine et un centre bi-nucléaire de fer, respectivement (Gin et al, 2003; Stenmark et al, 2001). La flavine oxydée de Coq6 est un accepteur à deux électrons, tandis que le centre bi nucléaire à fer (Fe^{III}-Fe^{III}) de Coq7 accepte également deux électrons, mais l'un après l'autre. Le NAD(P)H est donc le potentiel fournisseur d'électrons pour Coq6 tandis que la source d'électrons de Coq7 est encore inconnue.

IV.3. Les ferrédoxines et les ferrédoxines réductases

Chez les mammifères, le système de réduction du cytochrome P450 mitochondrial est constitué de deux protéines, une ferrédoxine Adx qui possède un centre [2Fe - 2S] et une ferrédoxine réductase AdxR. *S. cerevisiae* exprime une ferrédoxine mitochondriale (Yah1) et une ferrédoxine réductase mitochondriale (Arh1) qui sont les homologues de l'Adx et AdxR mais aucune mono-oxygénase mitochondriale de type cytochrome P450 n'a été identifiée chez cette levure.

Le système Yah1/Arh1 est vital et est situé dans la matrice mitochondriale (Barros & Nobrega, 1999; Manzella et al, 1998). Yah1 et Arh1 jouent un rôle essentiel dans la biogenèse des centres [Fe - S] (Lange et al, 2000; Li et al, 2001) et de l'hème A (Barros et al, 2002), un cofacteur indispensable pour la cytochrome c oxydase. Cox15, qui catalyse la conversion de l'hème O en hème A, est l'accepteur des électrons transférés par Yah1 (Barros et al, 2002), tandis que le destinataire n'est pas encore connu pour la biogenèse des centres [Fe - S].

Etant donné que la source d'électrons utilisée par Coq7 est inconnue, notre hypothèse était que le système Yah1/Arh1 pouvait potentiellement remplir ce rôle.

Matériels et Méthodes

A. Matériels

I. Souches utilisées

I.1. Souches de levures

Toutes les souches utilisées appartiennent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Le nom et le génotype des souches sont répertoriés dans le tableau ci-dessous:

Nom	Mat	Génotype	Sources
W303-1B	a	<i>ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-1,15</i>	R. Rothstein
BY4741	a	<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Yeast 12, 535
BY4741Δcoq3	a	<i>coq3Δ::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Science 285, 901*
BY4742Δcoq4	a	<i>coq4Δ::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Science 285, 901*
W303Δcoq5	a	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq5Δ::HIS3</i>	J. Biol. Chem. 272, 9182*
W303Δcoq6	α	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq6Δ::kanMX4</i>	J. Biol. Chem. 278, 25308
W303Δcoq7	α	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 coq7Δ::LEU2</i>	J. Biol. Chem. 271, 2995*
W303Δcoq8	α	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 abc1/coq8Δ::HIS3</i>	EMBO J. 1991, 2023
BY4742 Δcoq9	a	<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 coq9Δ::kanMX</i>	Science 285, 901*
Gal-YAH1	α	<i>ura3-1 ade2-1 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 Gal-YAH1:LEU2</i>	PNAS 2000, 1050
Gal-YAH1Δcoq6	a	<i>ura3-1 his3-11 ade? lys? trp? gal-YAH1:LEU2 coq6Δ::kanMX</i>	Ce travail

BY4741COQ6-3HA	a	<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 COQ6-3HA::HIS3</i>	Ce travail
Gal-YAH1 COQ6-3HA	a	<i>his3 ura3 COQ6-3HA::TRP1, Gal-YAH1::LEU2 LEU2 (YAH1)</i>	Ce travail
Δcoq7- Δcoq9	a	<i>ura3 his3 COQ7::LEU2, COQ9/COQ9::kanMX,</i>	Ce travail
BY4741 Δflx1	a	<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 flx1Δ::kanMX4</i>	Science 285, 901*

Tableau 1: Génotype et origine des souches de levure utilisées.

*: Ces souches ont été obtenues auprès d'EUROSCARF (European *S. cerevisiae* Archive for Functional Analysis)

I.2. Souches bactériennes

I.2.a. *E. coli* DH5α

F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG* Φ80dlacZΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(rK⁻ mK⁺), λ⁻.

Elle permet de produire des plasmides en grande quantité.

I.2.b. *E. coli* BL21

F⁻ *ompT gal dcm lon hsdSB*(rB⁻ mB⁻) λ(*DE3* [*lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]).

Cette souche est utilisée dans le but de surproduire une protéine (Coq6) dont le gène est sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du phage T7. Le répresseur LacI inhibe la transcription du gène d'intérêt et l'addition d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), (analogue non hydrolysable de l'allolactose) lève cette inhibition lorsqu'il est ajouté dans le milieu de culture.

II. Vecteurs plasmidiques et banque d'ADN génomique

II.1. Vecteurs levures

Les plasmides sont listés dans le tableau suivant.

Nom	Caractéristiques	Origine
pRS416	Vecteur centromérique, gène de résistance à l'ampicilline, un gène URA3 , un MCS (Multiple Cloning Site), une origine de réplication bactérienne et une origine de réplication de levure.	Genetics 122, 19-27 (1989)
pRS426	Vecteur multicopie, gène de résistance à l'ampicilline, un gène URA3 , un MCS, une origine de réplication bactérienne et une origine de réplication de levure.	Genetics 122, 19-27 (1989)
pRS423	Vecteur multicopie, gène de résistance à l'ampicilline, un gène HIS3 , un MCS, une origine de réplication bactérienne et une origine de réplication de levure.	Genetics 122, 19-27 (1989)
pRS425	Vecteur multicopie, gène de résistance à l'ampicilline, un gène LEU2 , un MCS, une origine de réplication bactérienne et une origine de réplication de levure.	Genetics 122, 19-27 (1989)
pRS425+COQ7	pRS425 contenant le gène <i>COQ7</i> avec son propre promoteur et terminateur cloné en utilisant les enzymes de restrictions HindIII et XhoI.	Ce travail
pRS423+COQ8	pRS423 contenant le gène <i>COQ8</i> avec son propre promoteur et terminateur cloné en utilisant les enzymes de restriction EcoRI et XhoI.	Ce travail

pRS416/26+COQ6	pRS416/26 contenant le gène <i>COQ6</i> avec le promoteur Met25 cloné en utilisant les enzymes de restriction XbaI et XhoI.	Ce travail
pRS416+YAH1	pRS416 contenant le gène <i>YAH1</i> avec son propre promoteur et terminateur cloné en utilisant les enzymes de restriction SacI et XhoI.	Ce travail
pRS426+COQ6-G202V	pRS426 contenant le gène <i>COQ6</i> portant la mutation ponctuelle G202V.	Ce travail
pRS426+COQ6-G386AN388D	pRS426 contenant le gène <i>COQ6</i> portant une double mutation G386AN388D.	Ce travail
pRS416+FDX1	pRS416 contenant le gène <i>FDX1</i> (<i>l'isoforme 1 de l'homologue humaine de Yah1</i>)	PNAS 107, 11775–11780 (2010)
pRS416+FDX2	pRS416 contenant le gène <i>FDX2</i> (<i>l'isoforme 2 de l'homologue humaine de Yah1</i>)	PNAS107,11775–11780 (2010)
pFL44+COQ8	<i>COQ8</i> a été cloné dans le vecteur mutlicopie pFL144 qui contient un gène de résistance à l'ampicilline, un gène URA3 , un MCS, une origine de réplication bactérienne et une origine de réplication de levure.	EMBO J. 10, 2023-31 (1991)*
FL44+COQ8-E409K	pFL44 contenant le gène <i>COQ8</i> portant une mutation ponctuelle E409K	Am. J. Hum. Genet. 82, 623-630 (2008) **
pFL44+COQ8-G130D	pFL44 contenant le gène <i>COQ8</i> portant une mutation ponctuelle G130D	Am. J. Hum. Genet. 82, 623-630 (2008) **

pFL44+COQ8-G130V	pFL44 contenant le gène <i>COQ8</i> portant une mutation ponctuelle G130V	Am. J. Hum. Genet. 82, 623-630 (2008)	**
pFL44+COQ8-R77W	pFL44 contenant le gène <i>COQ8</i> portant une mutation ponctuelle R77W	Am. J. Hum. Genet. 82, 623-630 (2008)	**
pRS423+FAD1	pRS423 contenant le gène <i>FAD1</i> avec son propre promoteur et terminateur en utilisant les enzymes de restriction EcoRI et XhoI.	Ce travail	
pRS416+COQ9	pRS416 contenant le gène <i>COQ9</i> avec le promoteur Met25 en utilisant les enzymes de restriction BamHI et XhoI.	don du Dr. Julia Cricco	

Tableau 2: Liste descriptive des plasmides utilisés.

*: Ce plasmide a été un don du Dr. Geneviève Dujardin.

**: Ces plasmides ont été un don du Dr. Agnès Rotig.

II.2. Vecteurs pour la surexpression hétérologue de la protéine Coq6

Pour la surexpression de Coq6 dans *E. coli*, ce gène a été inséré dans le plasmide pMAL c2X. Le gène *COQ6* est inséré en aval du gène *malE* qui code la protéine Maltose Binding Protein (MBP), permettant l'expression d'une protéine de fusion MBP. Le vecteur contient le promoteur fort tac et la séquence signal d'initiation de la traduction de *malE* pour permettre une forte expression des gènes clonés. Le vecteur contient également un site de clonage multiple et est porteur du peptide signal d'adressage des pré-protéines de fusion MBP dans le cytoplasme et d'une séquence codante pour le site de reconnaissance d'une protéase spécifique, qui va permettre le clivage de la protéine d'intérêt après purification. La MBP dans ces vecteurs a été introduite pour permettre la purification de la protéine de fusion par une chromatographie d'affinité sur une colonne d'amylose.

Pour le clonage de ces plasmides, voir partie *Clonage* (B.I.3) et pour la transformation et la sélection de ces plasmides, voir partie *Transformation* (B.II).

III. Milieux de culture

III.1. Milieux de culture de levure

Les milieux de culture de levure contiennent une composition de base (riche ou synthétique) et une source de carbone à 2% (pour la fermentation : glucose (Glu) ou galactose (Gal); pour la respiration : lactate-glycérol (LG)). Les constituants de ces milieux de culture proviennent de MP Biomedical (milieu synthétique) et Euromedex.

Une solution de bacto-agar est préparée et ajoutée à la concentration de 20 g/L afin de constituer un milieu solide.

Tous les milieux sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 min.

III.1.a. Milieu complet : YP

Composé de : 1% extrait de levure, 2% peptone auxquels est ajouté après autoclavage le glucose à 2% (YPD) stérilisé par autoclavage ou des solutions de galactose (YPGal) ou de lactate-glycérol à 2% (YPLG) stérilisé par filtration.

L'antibiotique G418 a été ajouté dans certaines conditions pour sélectionner les souches possédant une cassette kanMX4 (comme le cas de la souche $\Delta coq9$).

III.1.b. Milieu minimum synthétique (YNB)*

Composé de: 0.17% Yeast Nitrogen Base (YNB), 0.5% sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄), 2% d'une source de carbone et d'acides aminées et nucléotides pour lesquels la souche est auxotrophe. Ce milieu est utilisé pour sélectionner les souches contenant un ou plusieurs plasmides. Ce milieu contient du pABA à une concentration de 0.2 mg/L.

III.1.c. Milieu minimum synthétique-pABA-folate:(YNB-P)

Composé de: 0.17% Yeast Nitrogen Base (YNB), 0.5% sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄), 2% d'une source de carbone et d'acides aminées et nucléotides pour lesquels la souche est auxotrophe. Ce milieu ne contient pas de folate ni de pABA. La croissance dans ce milieu cause une limitation en précurseur du coenzyme Q. Ce milieu est donc utilisé pour tester l'effet des différents analogues de précurseurs sur la biosynthèse du coenzyme Q.

III.1.d. Milieu minimum synthétique avec 0.1% d'acide 5-fluoroorotique (5-FOA) (YNB-5-FOA)*

Ce milieu a la même composition qu'un milieu minimum synthétique mais il est supplémenté par 0.1 % d'acide 5-fluoroorotique. Il a été utilisé pour forcer les levures à perdre un plasmide contenant le gène URA3 car les levures ura⁺ sont sensibles à l'acide 5-fluoroorotique (5-FOA). En effet le 5-FOA est un analogue de l'acide orotique intervenant dans la biosynthèse de l'uracile: sa transformation par l'orotidine 5'-phosphate décarboxylase, enzyme codée par le gène URA3, mène à la formation d'un produit toxique pour la levure, le 5-fluorouracile. Les levures possédant le gène URA3 ne se développeront donc pas sur un milieu contenant du 5-FOA. En revanche les clones ne possédant pas le gène URA3 et donc déficients pour l'enzyme correspondante seront incapables d'utiliser le 5-FOA et de synthétiser le produit toxique qui en dérive: ils se développeront donc sur un tel milieu, si celui-ci contient de l'uracile.

III.1.e. Milieux solides utilisés pour la sporulation

Pré-sporulation : 0.8% extrait de levure, 0.3% Peptone, 10% glucose.

Sporulation : 1% acétate de potassium.

III.2. Milieux de culture des bactéries

III.2.a. Milieu LB (Luria-Bertani)

Composé d'extrait de levure 0.5%, du peptone 1% et NaCl 0.5%.

La sélection et la croissance des bactéries contenant un plasmide possédant une résistance à l'ampicilline se font sur un milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 µg/mL.

Du glucose a été ajouté dans ce milieu pour la surexpression de MBP-COQ6 afin de réprimer l'expression du gène codant pour l'amylase car cette protéine pourrait dégrader l'amylose de la résine.

IV. Anticorps utilisés

IV.1. Anticorps primaires

Anti-HA (monoclonal) et anti-Yah1 (polyclonal): l'anticorps anti-HA reconnaît le motif hémagglutinine (HA) et a été produit chez la souris. L'anticorps anti-Yah1 reconnaît la protéine Yah1 de *S. cerevisiae* et a été produit chez le lapin. Cet anticorps nous a été fourni par le groupe de R. Lill. Ces anticorps sont utilisés en western blot à la dilution 1/5000.

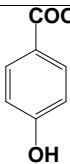
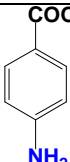
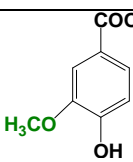
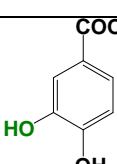
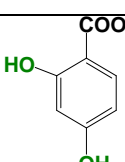
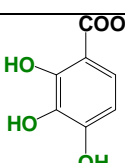
IV.2. Anticorps secondaires

Nous avons utilisé un anticorps anti IgG de souris produit chez le lapin (pour anti-HA) et un anti IgG de lapin (pour anti-Yah1). Ces deux anticorps sont couplés à la peroxydase de Raifort (HRP) et sont utilisés en western blot à la dilution 1/10000.

V. Produits chimiques et biologiques

La majorité des produits chimiques et de biologie moléculaire proviennent des sociétés Bio-Rad, ou Sigma. Les oligonucléotides ont été fournis par Eurofins. Les analogues de substrats ont été fournis par Sigma. Les enzymes de restriction proviennent de Fermentas.

V.1. Analogues de précurseurs du coenzyme Q_6

Nom	Structure	Origine
Acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB)		Sigma Aldrich CAS: 99-96-7
Acide para-aminobenzoïque (pABA)		Sigma Aldrich CAS: 150-13-0
Acide 3-méthoxy-4-hydroxybenzoïque Acide Vanillique (VA)		Sigma Aldrich CAS: 121-34-6
Acide 3,4-dihydroxybenzoïque (3,4-diHB)		Sigma Aldrich CAS: 99-50-3
Acide 2,4-dihydroxybenzoïque (2,4-diHB)		Sigma Aldrich CAS: 89-86-1
Acide 2,3,4-trihydroxybenzoïque (2,3,4-triHB)		Sigma Aldrich CAS: 610-02-6

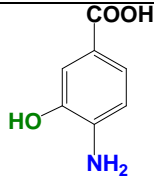
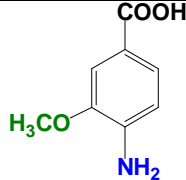
Acide 3-hydroxy-4-aminobenzoïque (3O,4N-B)		Sigma Aldrich CAS: 2374-03-0
Acide 3-méthoxy-4-aminobenzoïque (AMB)		Sigma Aldrich CAS: 2486-69-3

Tableau 3: Liste d'analogues de précurseurs utilisés.*V.2. Oligonucléotides*

<i>Utilisation des amorces</i>	<i>Séquence nucléotidique de l'amorce</i>	<i>TM (°C)</i>
Clonage du gène COQ8 dans pRS423	F1 (XhoI):GCTATTGGCAGAAG CTCGAG CGTTGCTAAG	68
	R1(EcoRI):GGTCT GAATTC GATCCGGGTGTTCGG	70
Construction du COQ6- 3HA	F1:CGGTCCAGTTAAGAATATGATCATTGACACATTAG	>75
	GAGGAAATGAGAAACGGATCCCCGGGTAAATTAA R1 :CAGGTTTACCTTTTATTCTGCTTGTGGTGACGCGTG TATCCGCCCCGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	>75
Clonage du gène COQ7 dans pRS425	F1(XhoI) : ATCG CTCGAG GGTACTCTGTCTATATTTCCC	68
	R1(XbaI) : AGCTAAGCTTCCT CTAG ACTATGAACCC	67
Clonage du gène <i>FAD1</i> dans pRS423	F1(EcoRI):TTTAACTAGA AATTC GGTAGAAAATTATTCAAACC	61
	R1(XhoI) : CAACGTTCC TCGAG GCAATATTA ACTATCACG	67

Construction du Coq6-G202V	F1: GCTAGTGGGTGCAGACG <u>T</u> ATTCAATTCTCC	64
	R1: CTGGTAGGAGAATTGAAT <u>A</u> CGTCTGCACC	65
Construction du Coq6-G386A et N388D	F1: CCTCTCGCTGGACAGG <u>C</u> TTAGACATGGGGC	67
	R1: CGTCTGTTTGCCCCATGT <u>C</u> TAAAGCCTGTCCAGC	66

Tableau 4: Liste des oligonucléotides utilisés pour la construction des plasmides. Les sites de coupure des enzymes de restriction sont en gras. Les nucléotides modifiés utilisés pour générer les mutants *coq6* sont soulignés.

B. Méthodes

I. Biologie Moléculaire

I.1. Extraction d'ADN

I.1.a. Pour les bactéries

Le kit « extraction d'ADN plasmidique, EZ-10 Spin Column » de la compagnie « BIO BASIC INC » est utilisé pour l'extraction d'ADN plasmidique. Les plasmides purifiés sont utilisés pour le séquençage, le clonage et la transformation des bactéries ou des levures. L'extraction est faite suivant les recommandations du manufacturier.

I.1.b. Pour les levures

L'extraction d'ADN de levure est faite dans le but de purifier l'ADN génomique ainsi que les plasmides ayant été introduit dans les transformants. Elle est réalisée suivant le protocole décrit par Hoffman & Winston en 1987. L'ADN purifié est utilisé pour construire une banque,

pour servir comme Template pour la PCR ou pour une transformation dans *E. coli* afin d'amplifier un plasmide d'intérêt.

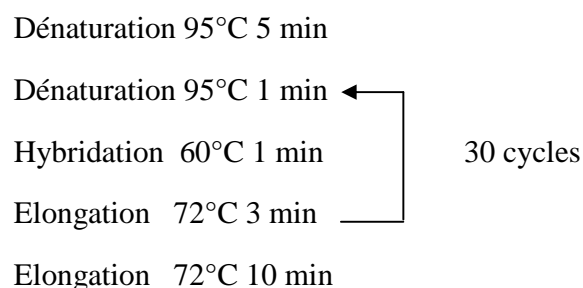
I.2. Technique de la PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

I.2.a. Amplification de l'ADN

Cette technique est utilisée pour l'amplification de l'ADN. Les fragments amplifiés sont utilisés pour le clonage ou pour le séquençage (recherche de mutations). L'amplification est réalisée par PCR, dans un volume final de 50 μ L. Dans un tube à PCR, on ajoute :

- 10 ng d'ADN matrice,
- 1 μ L de chaque amorce (sens et antisens) à 100 μ M,
- 1 μ L de Taq Polymérase (5 U/ μ L),
- 2 μ L de dNTP à 10 mM et
- 5 μ L de Tampon 10X
- qsp H₂O à 50 μ L.

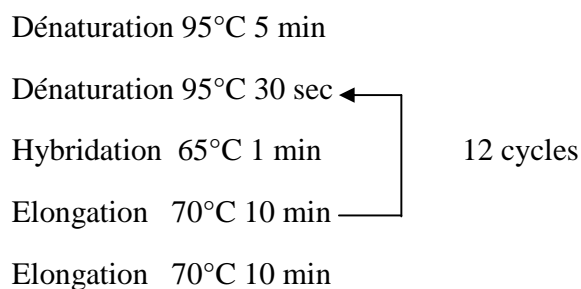
Le thermo-cycleur est réglé, par exemple, pour effectuer le programme suivant :



I.2.b. Mutagenèse dirigée

La même technique est utilisée avec des amorces qui ne possèdent pas de sites de restriction mais des nucléotides spécifiquement modifiés pour introduire une ou plusieurs mutations ponctuelles sur le gène d'intérêt (COQ6). La Pfu polymérase est l'enzyme utilisée au cours de cette mutagenèse. Au cours de cette expérience, l'ensemble du plasmide servant de

matrice est amplifié, ce qui se traduit par des temps d'élongation plus longs. La mutagenèse dirigée est réalisée selon le protocole habituel (QuickChange Site Directed Mutagenesis, Stratagene).



Le produit de PCR est ensuite digéré par la Dpn1, une enzyme qui coupe les séquences méthylées de l'ADN parental (template). Après amplification du plasmide chez *E. coli*, le plasmide est envoyé au séquençage pour vérifier l'insertion des mutations.

I.3. Clonage

I.3.a. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Deux types de digestion doivent être effectuées:

I.3.a.I. Digestion du fragment d'ADN obtenu par PCR

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont purifiés avec le kit « extraction d'ADN de PCR, EZ-10 Spin Column » de la compagnie « BIO BASIC INC ». L'ADN purifié va ensuite subir une digestion à 37°C pendant 3 heures par les enzymes de restrictions appropriées puis de nouveau être purifié.

I.3.a.II. Digestion du plasmide

Les plasmides sont digérés en même temps et dans les mêmes conditions que les morceaux d'ADN à insérer. Pour de telles digestions, le mélange réactionnel est composé d'une

quantité d'ADN (10 µg), $\frac{1}{10}$ de volume de tampon à 10X choisi suivant les enzymes utilisées, 1 unité d'enzyme de restriction par µg d'ADN à digérer et d'un volume déterminé d'eau stérile. Parfois la digestion des plasmides est faite sur la nuit à 37°C. Le plasmide digéré va ensuite subir une purification sur gel d'agarose. La bande d'intérêt est découpée sur gel et ensuite purifiée grâce au kit « extraction d'ADN du gel d'agarose, EZ-10 Spin Column » de la compagnie « BIO BASIC INC ».

1.3.b. Ligation

Le plasmide et l'insert digérés sont incubés en proportion 1:0; 1:1; 1:2; et 1:5. A ce mélange, du tampon de ligation à 10X est ajouté ainsi qu'une unité de ligase puis le volume est complété avec de l'eau (volume total 15 µL). La réaction peut se faire à 16°C pendant 4 heures ou bien toute la nuit à 4°C. Le mélange est transformé dans 150 µL de bactéries compétentes. Les plasmides purifiés des bactéries sont ensuite analysés sur gel d'agarose après digestion par les enzymes correspondantes.

1.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

1.4.a. Pour le diagnostique

Les électrophorèses sont réalisées sur des gels d'agarose à 1%. L'agarose est dissout en le portant à ébullition dans du tampon TAE à 1X (Tris/Acétate 40 mM pH 8, EDTA 1 mM). Du tampon de chargement à 6X (bleu de bromophénol à 0,1%, glycérol à 50%, SDS à 1%, EDTA à 100 mM pH 8) est ajouté à l'ADN qui est déposé dans les puits. Des marqueurs de longueur moléculaire sont inclus dans chaque gel. La migration se fait dans une cuve à électrophorèse remplie de TAE à 0,5X, sous une tension de 130 volts pour 25 min. Ensuite le gel est mis dans une cuve contenant du bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/mL pour colorer l'ADN afin de pouvoir le visualiser sous une lampe UV ce qui nous permet de vérifier des constructions plasmidiques et déterminer la taille de l'insert ou d'un plasmide. A la fin de ma thèse, le BET a été remplacé par du 'Sight DNA stain' d'Euromedex et qui est directement ajouté dans le gel d'agarose lors de sa préparation.

I.4.b. Purification d'ADN sur gel d'agarose

La bande d'intérêt est découpée à l'aide d'un scalpel et déposée dans un tube. Le fragment de gel extrait est traité suivant le kit « extraction d'ADN du gel d'agarose, EZ-10 Spin Column » de la compagnie « BIO BASIC INC ».

II-Transformation

II.1. Pour les bactéries

II.1.a. Préparation des bactéries compétentes

La base de la préparation des bactéries compétentes est l'utilisation de CaCl_2 qui dégrade leurs lipopolysaccharides de surface les rendant ainsi aptes à la transformation par un vecteur. Nous avons utilisé le protocole de D. Hanahan (Maniatis et al, 1982). La souche DH5 α est mise en croissance sur une boîte LB à 37°C toute une nuit. Une dizaine de colonies sont inoculées dans 250 mL de milieu LB à 37°C jusqu'à l'obtention d'une $\text{DO}_{600} = 0,6$. La culture est alors refroidie pendant 10 min dans la glace, puis centrifugée à 3000 rpm pendant 10 min à 4°C. Il est important de garder les cellules à 0-4°C durant le reste des manipulations. Après avoir jeté le surnageant, les cellules sont lavées avec 16,5 mL d'une solution RF1 stérile et froide, pour être ensuite centrifugées dans les conditions précédentes. Le culot cellulaire est resuspendu dans 4 mL d'une solution RF2 stérile et froide puis est maintenu dans la glace pendant 15 min. Les cellules rendues compétentes sont aliquotées par 150 μL dans des tubes Eppendorf froids et sont congelées dans l'azote liquide. Elles sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

RF1: pH=5.8

RF2: pH=6.8

Composé	Concentration	Composé	Concentration
RbCl	100 mM	MOPS	10 mM
MnCl ₂	50 mM	RbCl	10 mM
Acétate de potassium	30 mM	CaCl ₂	75 mM

CaCl ₂	10 mM	Glycérol	15%
Glycérol	15%		

II.1.b. Transformation des bactéries par choc thermique

Lors de la transformation, 0.5 µg d'ADN est mis en présence de 150 µL de cellules compétentes sur glace pendant 30 min. Un choc thermique pendant une minute à 42°C est ensuite effectué. Ceci permet d'accentuer la déstabilisation de la bicouche lipidique et de stimuler la pénétration de l'ADN plasmidique dans les cellules. Les cellules sont ensuite placées sur glace pendant environ 2 min avant d'ajouter 0,85 mL de milieu LB. Les cellules sont incubées à 37°C pendant 45 min avant d'être étalées sur un milieu LB solide contenant l'antibiotique adapté à la sélection du plasmide. Les boîtes sont incubées la nuit à 37°C.

*II.2. Transformation de *S. cerevisiae**

Contrairement aux bactéries, il n'est pas possible de stocker des levures compétentes. Pour cela, les différentes souches de levure sont transformées directement en suivant le protocole décrit par R. Agatep et coll. en 1998. Quelques millilitres de milieu YPD/YNB* sontensemencés avec une colonie et mis en croissance à 30°C sur la nuit. Après une mesure de la DO à 600nm, la culture est diluée dans 10 mL de milieu YPD/YNB* frais à une DO₆₀₀ de 0,1 afin de relancer la croissance des cellules. En effet, les cellules en phase exponentielle de croissance se prêtent davantage à la transformation que les cellules en phase stationnaire qui sont plus résistantes. Après une croissance à 30°C jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,6, le culot est récupéré par centrifugation puis lavé avec de l'eau stérile puis re-centrifugé à température ambiante à 10000 rpm, 3 min. Après élimination de l'eau, le culot est repris dans 800 µL d'une solution d'acétate de lithium (LiAc) 100 mM. L'acétate de lithium va permettre de fragiliser la paroi de la levure. Cette réaction dure pendant 5 min à température ambiante. Après centrifugation à 10000 rpm, 3 min, le surnageant d'acétate de lithium est éliminé. Le culot de levures est alors repris dans une solution comprenant 240 µL d'une solution de PEG3350 40%, 36 µL de LiAc 1M, 10 µL d'ADN carrier (ADN de sperme de saumon simple brin à 10 mg/mL), 40 µL d'eau et enfin

l'ADN transformant (100 à 500 ng). Le mélange est laissé 30 min à 30°C, puis placé 30 min dans un thermo-bloque à 42°C pour réaliser le choc thermique qui va permettre l'entrée de l'ADN transformant dans les cellules de levure. Après une centrifugation à température ambiante à 10000 rpm, 3 min, les cellules sont reprises dans 100 µL d'eau stérile, puis étalées sur un milieu qui permettra la sélection des transformants.

II.3. Banque de surexpression d'ADN génomique

Afin d'essayer d'identifier la déaminase, nous avons transformé une banque de surexpression d'ADN génomique dans le mutant $\Delta coq6/Coq8$. Cette banque de surexpression a été construite par Fabien en 2007 (Pierrel et al, 2007) en clonant des fragments d'ADN génomique d'une taille comprise entre 3 et 10 kb au site BamH1 du plasmide multicopie Yep352 qui contient un marqueur URA3.

III. Méthodes génétiques

III.1. Conjugaison des cellules haploïdes

Pour construire des diploïdes, il faut croiser des haploïdes de signes sexuels opposés. Chez la levure, mat a et mat α sont les marqueurs sexuels différentiels. Pour sélectionner les diploïdes, il nous faut des marqueurs phénotypiques. Lorsque les souches à croiser proviennent du même fond génétique et n'ont donc pas de marqueurs phénotypiques différents, les souches haploïdes sont transformées par des plasmides portant des marqueurs de sélection différents, par exemple les gènes URA3 et LEU2. Ces gènes codent pour des enzymes nécessaires à la synthèse de l'uracile et de la leucine respectivement. Après croisement des souches haploïdes, les souches diploïdes sont sélectionnées sur un milieu déficient en uracile et en leucine. En pratique, la conjugaison des deux souches haploïdes (URA3 mat a et LEU2 mat α) est effectuée par leur mélange sur un milieu YPD solide. Après 24 heures à 30°C, ce mélange est répliqué sur le milieu de sélection n'autorisant que la croissance des diploïdes formés : YNB*D -Ura -Leu.

III.2. Sporulation des cellules diploïdes et dissection des tétrades

Afin d'obtenir des cellules haploïdes à partir de cellules diploïdes, on les fait sporuler. Pour cela on réplique les souches diploïdes sur un milieu riche de présporulation. Après une nuit à 30°C, ces cellules sont répliquées sur milieu de sporulation. Après environ cinq jours, on obtient suffisamment de tétrades pour les disséquer. Chaque tétrade contient quatre spores enfermées dans un asque. Les asques sont mis en suspension dans une solution de lyticase (dans 1,2 M Sorbitol) pendant 10 min à température ambiante afin d'hydrolyser leurs parois. Les tétrades sont alors déposées sur des boîtes de milieu riche YPD-agar et disséquées à l'aide d'un microscope (Nikon) équipé d'un micromanipulateur. Les boîtes sont incubées à 30°C (1 ou 2 jours) ce qui permet aux spores de germer et de former des colonies. La présence des marqueurs ou des phénotypes d'intérêt dans les différentes spores est ensuite testée par réplique sur des milieux sélectifs. La dissection des tétrades permet de combiner des mutations ($\Delta coq7$ - $\Delta coq9$) ou des modifications dans différents gènes (Gal-YAH1 COQ6-3HA) dans des génomes haploïdes.

III.3. Test de dilution en série

Les cellules, récupérées en phase exponentielle de croissance, sont lavées avec de l'eau stérile avant d'être diluées en série (10%) à partir d'une solution de cellules à une DO_{600} de 1. Des gouttes de 5 μ L de chaque solution sont déposées sur des milieux nutritifs gélosés puis les boîtes sont incubées à 30°C pendant 2 jours (sur Glu) ou 4 jours (sur LG).

IV. Méthodes Biochimiques

Extraction et dosage des quinones

Méthodes de separation

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur colonne de phase inverse permet la séparation des constituants d'un mélange selon leur hydrophobie relative. La phase stationnaire est majoritairement composée de silice greffée par des groupements hydrophobes, le plus souvent des chaînes linéaires de 18 atomes de carbones (C-18). La phase mobile est un solvant polaire. Ainsi, les composés sont élués dans l'ordre de leur hydrophobie croissante.

IV.1. Extraction des quinones

Les cellules sont récoltées par centrifugation après une culture d'une nuit dans 5 mL de milieu riche ou synthétique. La masse humide des cellules est déterminée et servira à normaliser la quantité d'extraits analysés. 50 µL d'eau, 100 µL de billes de verre, un volume de coenzyme Q₄ (Q₄) servant comme standard interne, 600 µL de méthanol et 400 µL d'éther du pétrole (point d'ébullition 45°-60°) sont ajoutés par échantillon. Le tout est vortexé pendant 5 min et suivi de 5 min de centrifugation à 6000 rpm. La phase supérieure (éther de pétrole) est prélevée puis 400 µL d'éther de pétrole sont ajoutés et les étapes de vortexation/centrifugation sont répétées. La phase supérieure est prélevée et combinée à la précédente. Cet extrait lipidique, qui contient le coenzyme Q₆ et les intermédiaires de biosynthèse, est ensuite évaporé sous un flux d'argon et les échantillons sont stockés à -20°C avant analyse.

IV.2. Dosage de quinone par (HPLC-ECD)

Les extraits lipidiques secs sont resuspendus dans 100 µL d'un mélange de 98% éthanol et 2% perchlorate de lithium 1M. Un aliquot correspondant aux extraits de 5 mg de cellules (sauf indication contraire) est analysé par Chromatographie Liquide à Haute Performance en phase

reverse (HPLC) sur un appareil HP, HEWLETT PACKARD, SERIES 1100. Un schéma du système HPLC-ECD est représenté en figure 18. Comme une partie de Q_6 présent dans les extraits lipidiques est sous forme oxydée (Q_6) et l'autre est sous forme réduite (Q_6H_2), les molécules de Q_6H_2 sont oxydées avec une électrode 5020 située avant la colonne et réglée à un potentiel oxydant (+650 mV). La colonne HPLC utilisée est de type C18 (Betabasic-18, 5 μ m, 4.6 x 150 mm, Thermo Scientific). L'élution des molécules est réalisée à 1mL/min avec 98% méthanol-20 mM perchlorate de lithium pendant 18 min. En sortie de colonne, un détecteur UV-visible à barrette de diode permet d'enregistrer les chromatogrammes à différentes longueurs d'ondes et d'enregistrer les spectres d'absorption UV-visible des composés d'intérêt. La détection et la quantification des quinones se fait avec un détecteur électrochimique (ESA Coulochem III) et une cellule électrochimique analytique 5011A constituée de deux électrodes en série (E1, -550mV pour la réduction de Q_6 ; E2, +550 mV pour la réoxydation de Q_6H_2). Les électrochromatogrammes présentés dans la suite du manuscrit correspondent au signal obtenu à l'électrode E2. Une gamme étalon du standard interne Q_4 est faite dans les mêmes conditions d'analyse. Cette gamme a pour but, d'une part de normaliser la quantité du coenzyme Q_6 et des autres intermédiaires dans les différents échantillons en tenant compte du matériel éventuellement perdu lors de l'extraction et d'autre part de convertir l'air du pic électrochimique du coenzyme Q_6 en pmoles.

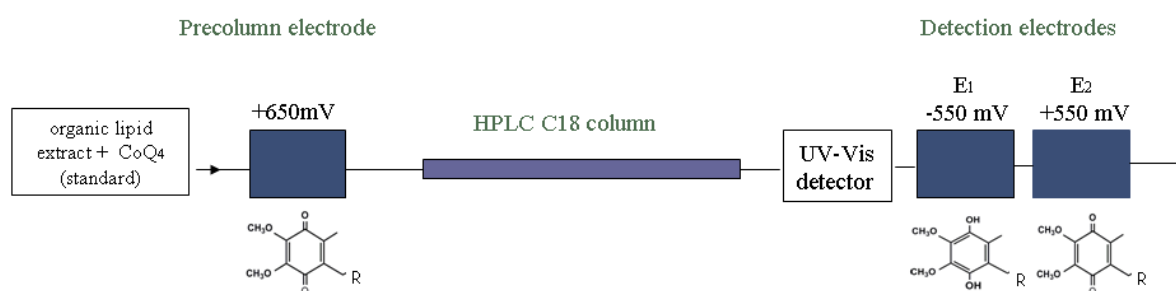


Figure 18: Schéma représentatif du système HPLC-ECD utilisé.

IV.3. Electrophorèse et analyse des protéines par Western-Blot

La méthode d'analyse des protéines par Western blot comporte quatre étapes distinctes:

IV.3.a. Préparation d'extraits de protéines de levures

Cette préparation est adaptée de la méthode développée par Herkowitz et coll. en 1993. Les protéines sont extraites à partir d'une culture à une DO_{600} de 1. Les cellules sont récoltées par centrifugation à 10000 rpm/5 min/4°C. Le culot cellulaire est repris dans 500 µL de tampon TCA (acide trichloroacétique) et transféré ensuite vers un tube eppendorf contenant 100 µL de billes de verres suspendues dans 500 µL de TCA 20%. Les tubes sont mis à vortexer pendant 5 min à 4°C ce qui permet la lyse des cellules et l'extraction des protéines. Après 10 min de centrifugation (10000 rpm) à température ambiante, le culot est resuspendu dans 300 µL du tampon TCA-Laemmli. Les échantillons sont ensuite portés à ébullition pendant 10 min. Les débris cellulaires et membranes sont éliminés par centrifugation à 10000 rpm/5 min/30°C. Ces échantillons peuvent être conservés à -20°C.

Tampon TCA (pour 10 mL):

- 200 µL 1M Tris pH 8
- 66.6 µL 7.5M acétate d'ammonium
- 9.7 mL d'eau
- 0.5 mM PMSF (flurorure de phenylméthanesulfonyle)

Tampon TCA-Laemmli:

- 480 µL de la SOL I
- 400 µL de la SOL II
- 120 µL de la SOL III

SOL I:

- 200 mM Tris base
- 20 mM EDTA
- qsp H₂O à 10 mL

SOL II:

- 3.5 mL 100% glycérol
- 1 mL 1M Tris base
- qsp H₂O à 12 mL

SOL III:

- 1M DTT dans de l'eau

IV.3.b. Electrophorèse des protéines

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, selon leur poids moléculaire. Il existe une relation linéaire entre le logarithme des poids moléculaires des protéines et leur mobilité électrophorétique. Le poids moléculaire apparent des

protéines étudiées peut être déterminé par référence avec des protéines de poids moléculaire connu (Bio-Rad).

Avant d'être déposés sur gel, les échantillons sont additionnés d'une solution de tampon dénaturant contenant 500 mM de Tris-HCl pH 6.8/ 5% SDS/ 10% Glycérol/ 2% β -mercaptoéthanol/ 2% bleu de bromophénol, et portés à ébullition pendant 5 min. Ce tampon contient du SDS, détergent fortement anionique qui dénature les protéines et les charge négativement, ainsi que du β -mercaptoéthanol, agent réducteur qui rompt les ponts disulfures des protéines. La température élevée favorise la désagrégation et la dénaturation des protéines. Cette étape a été réalisée pour analyser des échantillons protéiques au cours de la purification de Coq6. Dans le cas de western-blot sur les extraits de levures, les échantillons préparés selon IV-3-a sont directement portés à ébullition pendant 5 min car ils ont déjà été dénaturés. Lors de la migration, les protéines sont séparées sur un gel contenant 12% d'une solution d'acrylamide/bis-acrylamide (Bio-Rad). La migration est réalisée à 200 V dans un tampon Tris 25 mM pH 8.3/ glycine 192 mM/ SDS 1%, et est arrêtée au bout de 30 min lorsque le front de migration (visualisé par le bleu de bromophénol) atteint la limite inférieure du gel. Le gel est alors soumis à un électrotransfert pour une analyse des protéines par Western-Blot.

IV.3.c. Electrotransfert des protéines

L'électrotransfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Bio-Rad). Le transfert est effectué pendant une heure et demi à 200V et une intensité maximale de 150 mA dans un tampon Tris 25 mM pH 8.3/ glycine 192 mM/ isopropanol 10% dans une cuve Transblot (Bio-Rad).

IV.3.d. Immunodétection des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose

La membrane de nitrocellulose est incubée pendant 30 min dans du tampon PBST+lait (NaCl 136 mM/ Na_2HPO_4 8 mM/ KH_2PO_4 1,5 mM/ KCl 2,7 mM pH 7.4 et contenant 0,1% de Tween et du lait en poudre à 25 g/L). Les protéines du lait vont saturer les sites non spécifiques sur la membrane de transfert. Après saturation, la membrane est lavée trois fois avec du PBST

avant l'incubation avec l'anticorps primaire (anti-HA ou anti-Yah1) dirigé contre le tag 3-HA et la ferrédoxine Yah1 respectivement (dilution 1/5000). L'incubation se fait sur la nuit à 4°C.

Le lendemain et après trois lavages de 10 min dans du PBST, la membrane est incubée pendant 3 heures avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP). Elle est ensuite lavée trois fois pendant 5 min dans du PBST.

La présence des protéines reconnues par les anticorps est ensuite révélée par la détection de l'activité de la HRP grâce au kit SuperSignal West Pico ChemiLuminescent Substrat (Thermo SCIENTIFIC). La HRP catalyse l'oxydation du luminol en présence d'eau oxygénée. Le luminol retourne ensuite à son état réduit en émettant une lumière visualisée par l'appareil Fusion Fx7.

V. Préparation des solutions des analogues de substrats

Les solutions stocks des analogues de précurseurs du Coenzyme Q à 100 mM ont été préparées dans du tampon PBS 1X pH 7.4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄) par dissolution grâce à une titration avec du NaOH 1M. On a pris soin de ne pas dépasser une valeur de pH supérieure à 9. Ensuite, les solutions ont été filtrées et des aliquotes ont été congelés dans l'azote liquide et stockés à -20°C pendant plusieurs mois. Ces analogues ont été ajoutés dans le milieu YNB-P à différentes concentrations.

VI. Spectroscopie d'absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible ont été enregistrés dans des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique pour déterminer la DO à 600 nm pour suivre la croissance ou entre 200 et 800 nm pour les dosages des protéines.

Un spectrophotomètre nanodrop est utilisé pour déterminer la concentration d'ADN à partir d'1 µL de solution.

VI.1. Dosage protéique

VI.1.a. Méthode de Bradford

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Une gamme étalon avec la protéine BSA (Bovine Serum Albumin) est réalisée dans les mêmes conditions pour nous permettre de déterminer la concentration protéique de nos échantillons.

VII. Surexpression et Purification de Coq6

VII.1. Surexpression de Coq6-MBP

La Souche *E. coli* BL21 a été transformée par le vecteur pMALc2-COQ6 et les transformants sont sélectionnés sur un milieu solide LB-Agar contenant 100 µg/mL d'ampicilline. 100 mL de LB liquide+Amp sont inoculés par une dizaine de colonies puis incubés à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, les cellules en phase stationnaire de croissance sont inoculées à 1% dans 5 litres de milieu LB+Amp supplémenté par 0,2% glucose puis cultivées sous agitation à 37°C. Lorsque la DO₆₀₀ atteint 0.4, la surexpression de la protéine Coq6 est alors induite par l'ajout de 400 µg/L d'IPTG. La culture est ensuite poursuivie à 15°C toute la nuit. Ces conditions de surexpression ont été optimisées afin d'obtenir la protéine Coq6 en partie sous forme soluble. En effet, dans des conditions permettant une plus forte expression (température plus forte après induction), la protéine était surexprimée sous forme insoluble (corps d'inclusion). Au matin, les cellules sont récoltées par centrifugation (10000 rpm/5 min/4°C), rincées avec de l'eau stérile, congelées dans l'azote liquide puis stockées à -80°C jusqu'à l'utilisation.

VII.2. Préparation des extraits protéiques solubles

Les bactéries sont décongelées et lysées par sonication sur glace en présence de tampon 20 mM Tris-HCl et 200 mM NaCl. Dix cycles de 30 secondes de sonication (à 70 watts) alternant avec 30 secondes de repos sont réalisés. Les broyats cellulaires sont ensuite ultracentrifugés pendant 1h30 à 45000 rpm et à 4°C. Nous avons conservé 2 fractions par broyat cellulaire: le surnageant (S) et le culot (C). Le culot est conservé pour être analysé sur gel par la suite et le surnageant correspondant aux extraits solubles protéiques est prélevé et placé à 4°C.

VII.3. Purification de Coq6 sur colonne

Toutes les étapes de purification sont réalisées en chambre froide à 4°C avec un système de chromatographie de type FPLC (Fast protein liquid chromatography) Biologic (Bio-Rad).

VII.3.a. Colonne de résine Amylose-MBP

5 mL de résine d'amylose (New England Biolabs) ont été coulés dans une seringue de 10 mL pour préparer la colonne qui servira à la purification puis rincés avec 20 volumes de résine de tampon d'équilibration 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl et 1 mM EDTA. Ce lavage de la résine est répété 3 fois. La colonne a été ensuite connectée au système FPLC.

Les extraits protéiques solubles sont chargés à 1mL/min sur la colonne d'amylose. La colonne est ensuite lavée avec 50 mL (10 volumes de colonne) du tampon d'équilibration 20 mM du Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl et 1 mM EDTA. Les protéines fixées sur la résine sont ensuite éluées par un gradient linéaire allant de 0 à 20 mM de maltose sur 50 mL à 1 mL/min. Coq6-MBP est éluée à environ 10 mM de maltose. Les fractions contenant Coq6 sont ensuite rassemblées et concentrées jusqu'à 2 mL à l'aide d'une unité d'ultrafiltration rapide (Amicon ultra 15 YMPD 10K, Millipore) garnie d'une membrane de cellulose régénérée.

VII.3.b. Colonne de tamisage moléculaire Superdex 200

La solution protéique concentrée est chargée sur une colonne Superdex 200 16/60 (Amersham Biosciences) préalablement équilibrée avec du tampon 20 mM du Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl. La séparation des protéines est réalisée à l'aide du même tampon et les fractions contenant Coq6 (identifiées par électrophorèse) sont récoltées, rassemblées, et concentrées par ultrafiltration. Ensuite les fractions sont aliquotées en volume de 500 µL, congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

VIII. Spectrométrie de masse

VIII.1. Spectrométrie de masse à haute résolution (HR-MS)

Pour l'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution, les intermédiaires de biosynthèse du Coenzyme Q purifiés et solubilisés dans du méthanol sont injectés dans une source nanospray ORBITRAP (Thermo Fischer Scientific) à un débit de 5 µL/min par l'intermédiaire d'un autosampler d'un système LC Ultimate 3000 (Dionex) avec une solution de 90 % d'isopropanol et 0.2 % d'acide formique. La méthode MS utilisait une plage de balayage de 150-1600 m/z et elle a été composée d'événements MS et MS/MS utilisant l'ORBITRAP comme analyseur (à une résolution de 30000) pour obtenir une grande précision à la fois sur les ions parents et les fragments. L'énergie de fragmentation est fixée à 35 keV (énergie de collision normalisée). QualBrowser de XCalibur est utilisé pour lire les spectres.

VIII.2. Analyse en HPLC couplée avec la spectrométrie de masse (HPLC-MS)

Ces analyses ont été effectuées avec une HPLC 1100 Agilent associée au spectromètre de masse triple quadripôle, SCIEX API3000. La séparation a été effectuée sur une colonne octadécylsilylé ODB Uptisphere (150 3 2 mm de diamètre, une granulométrie de 5 µm, Montluc, on, France), en utilisant un gradient d'acétonitrile dans 2 mM de formate d'ammonium. Les spectres de fragmentation ont été obtenus par la sélection d'ion pseudo-moléculaire dans le

premier quadripôle puis par leur fragmentation dans la cellule de collision. Le spectre de fragmentation a été enregistré dans la gamme 50-520 unités de masse.

VIII.2.a. Détection en mode MRM

Les expériences de MRM (multiple reaction monitoring), en utilisant un instrument à triple quadripôle, sont conçues pour obtenir le maximum de sensibilité pour la détection des composés. Les expériences MRM sont largement utilisées dans la détection et la quantification des métabolites de médicaments et de drogues. Connaissant la masse et la structure du composé, il est possible de prédire le précurseur m/z et une fragmentation m/z (MRM de transition) de ce composé. Dans le cas du coenzyme Q_6 et de ses dérivés, une fragmentation classiquement observée est celle qui conduit à la formation d'ions tropylium qui correspondent au noyau aromatique substitué avec un méthylène de la chaîne polyprényle (Marbois et al, 2010) (figure 19). Ainsi, Q_6 peut-être spécifiquement détecté à un temps d'élution particulier en enregistrant le précurseur $m/z=197$ (591/197 signifie ainsi que la détection des ions de transition est réalisée en MRM pour la transition 591,4 à 197). Ce mode de détection a été utilisé par nos collaborateurs américains pour la détection des différents intermédiaires de la voie de biosynthèse du coenzyme Q_6 accumulés dans les extraits de différentes souches mutantes.

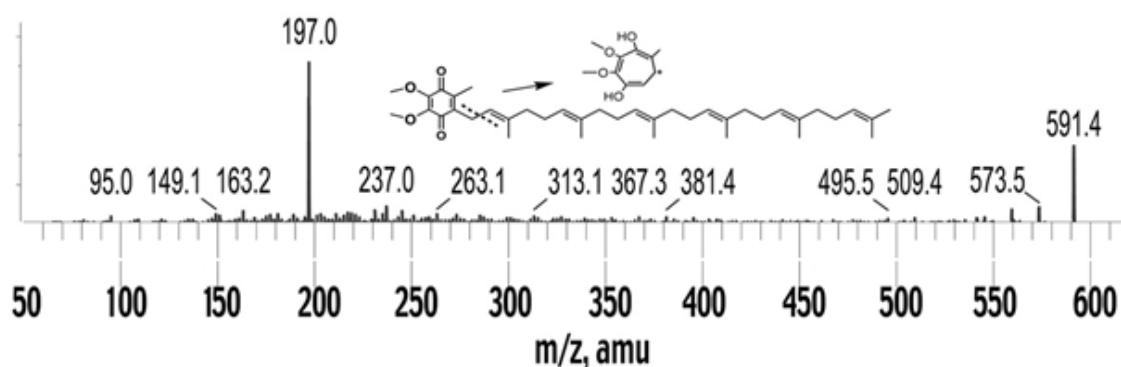


Figure 19: Spectre de masse de fragmentation du coenzyme Q_6 . La structure de Q_6 ainsi que la rupture de liaison (en pointillé) qui conduit à la formation de l'ion tropylium à $m/z=197$ sont indiquées. La masse moléculaire ionique $[M+H]^+$ du coenzyme Q_6 ($C_{39}H_{58}O_4^+$) est de 591,4 et celle de l'ion tropylium $[M]^+$ ($C_{10}H_{13}O_4^+$) est de 197,0.

Coq6: une mono-oxygénase qui catalyse l'hydroxylation en C5

Les résultats de la partie I sont présentés succinctement car la plupart de ces résultats avaient déjà été obtenus à mon arrivée au laboratoire. Cependant, la présentation de ces résultats est nécessaire à la compréhension de résultats que j'ai obtenus et qui sont détaillés dans les parties II, III, IV, V et VI.

I. La déplétion de la ferrédoxine mitochondriale Yah1 affecte l'hydroxylation en C5

Comme déjà mentionné à la fin de l'introduction, notre hypothèse au début de la thèse était que le système Yah1/Arh1 pouvait être impliqué dans la réduction de la mono-oxygénase Coq7.

I.1. La ferrédoxine mitochondriale Yah1 et la ferrédoxine réductase Arh1 sont essentielles pour la biosynthèse du coenzyme Q₆

Pour tester un rôle potentiel de la ferrédoxine mitochondriale Yah1 dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆, nous avons utilisé la souche Gal-YAH1 dans laquelle le promoteur natif du gène YAH1 a été remplacé par un promoteur GAL10 (Lange et al, 2000) inductible en galactose (Lange et al, 2000) et répressible en glucose. Nous avons noté que la déplétion du gène YAH1, après une culture de la souche Gal-YAH1 en glucose, entraîne une forte diminution du contenu des cellules en coenzyme Q₆ et en DMQ₆ dont les niveaux sont mesurés par détection électrochimique après chromatographie HPLC d'extraits lipidiques de cellules. D'une manière surprenante, un nouveau composé électroactif éluant vers 610 s a été détecté (figure 20). Ce nouveau composé n'est pas détecté dans la souche Gal-YAH1 transformée avec un plasmide contenant le gène YAH1 (figure 20) ou après une culture en galactose (données non présentées).

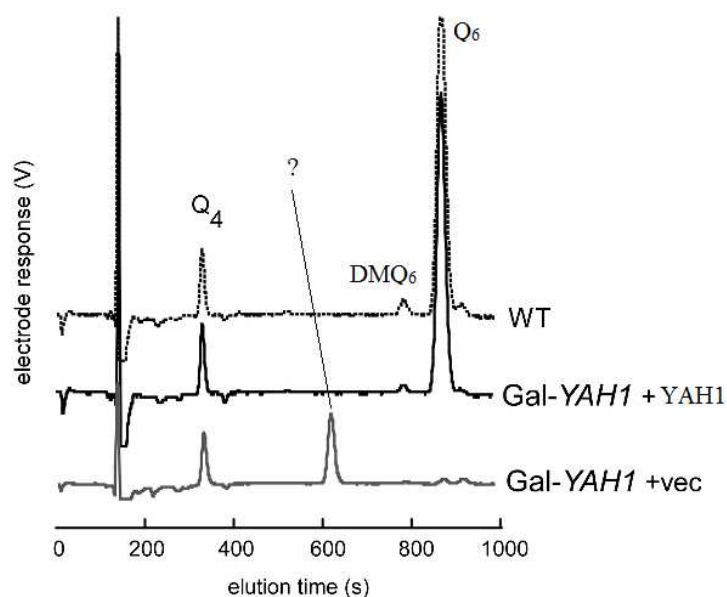


Figure 20: Accumulation d'un nouveau composé électroactif dans les cellules déplétées en Yah1. La souche WT et la souche Gal-YAH1 transformée soit un vide vecteur (vec) soit un vecteur contenant le gène YAH1 ont été cultivées en YNB* 2% glucose pendant 18 heures. Les extraits de 8 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD. Les positions d'élution du coenzyme Q₄ utilisé comme standard, de la DMQ₆, de Q₆ et du composé électroactif (?) accumulé dans les cellules déplétées pour Yah1 sont indiquées sur l'électrochromatogramme.

La déplétion de la ferrédoxine réductase Arh1 entraîne également la diminution de Q₆ et l'accumulation du même composé électroactif (données non présentées) montrant ainsi que l'absence d'un système ferrédoxine/ferrédoxine réductase fonctionnel diminue fortement les niveaux du coenzyme Q₆ et favorise l'accumulation de ce nouveau composé.

1.2. Accumulation de 3-hexaprényl-4-aminophénol (4-AP) et de 3-hexaprényl-4-hydroxyphénol (4-HP) dans la souche déplétée en Yah1

1.2.a. Spectrométrie de masse

La caractérisation du composé électroactif a commencé par sa purification par HPLC sous sa forme réduite. Une analyse par spectrométrie de masse à haute résolution en mode positif

a été ensuite réalisée pour déterminer la masse exacte de ce composé. La masse moléculaire ionique obtenue ($M+H^+$) avec un ratio m/z de 518,43610 correspond à une formule chimique $C_{36}H_{55}NO$ pour le composé (Pierrel et al, 2010).

I.2.b. Analyse par RMN

Pour révéler l'identité du composé purifié, une analyse par spectroscopie 1H RMN a été ensuite effectuée.

D'après la formule chimique du composé et le spectre RMN obtenu, certains pics bien définis peuvent être attribués facilement aux groupements carbonés de la chaîne polyisoprényle. La région aromatique du spectre a été comparée à celle enregistrée avec le produit commercial, le 3-méthyle-4-aminophénol (3M4Aphe). Les deux spectres sont quasiment superposables ce qui suggère fortement que le noyau aromatique de ces deux composés possèdent les mêmes substituants (Pierrel et al, 2010).

I.2.c. Spectres UV- visible

Les spectres d'absorption UV-visible des formes oxydées et réduites du composé accumulé dans la souche déplétée en Yah1 montrent des maxima d'absorption similaires à ceux obtenus avec le 3M4Aphe (figure 21).

L'ensemble de ces résultats ont permis d'identifier, sans ambiguïté, le 3-hexaprényl,4-aminophénol (4-AP) comme étant le composé électroactif accumulé dans la souche déplétée en Yah1 (figure 22).

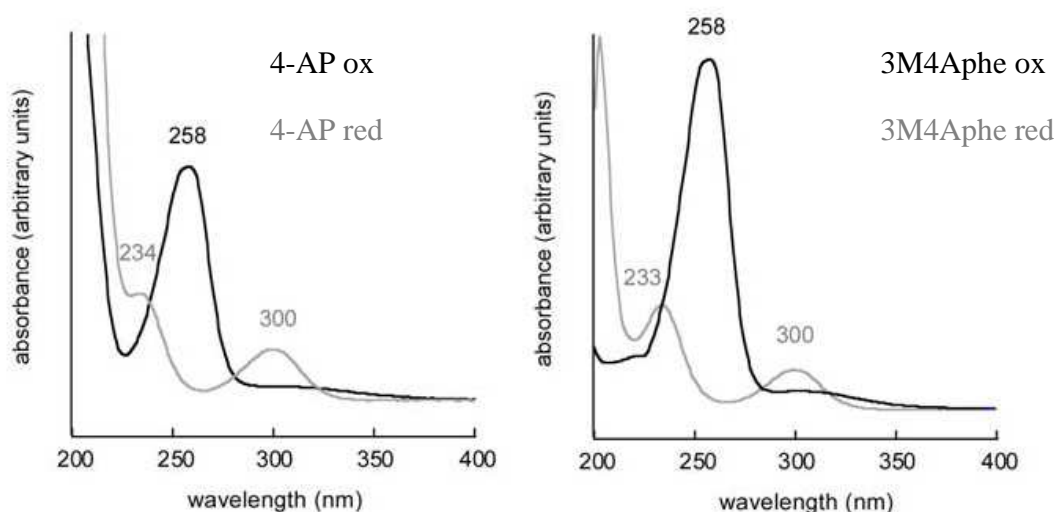


Figure 21: Comparaison des spectres UV-visible du 4-AP et du produit commercial (3M4Aphe). Une quantité égale du 3H4Aphe et du 4-AP a été injectée sur la colonne de HPLC avec un potentiel de l'électrode de précolonne fixé à +550 mV (ox) ou -500mV (red). Les spectres UV-visible des formes oxydées (ox) et réduites (red) de 3H4Aphe et 4-AP ont été enregistrées et les maxima d'absorption sont indiqués.

En remplaçant le YNB* (milieu minimum utilisé dans les expériences précédentes) par du YPD (milieu riche contenant 2% glucose), un nouveau composé électroactif éluant à 800 s a été accumulé dans la souche déplétée en Yah1. La caractérisation de ce composé purifié par spectrométrie de masse et UV-visible ont permis de l'identifier comme étant le 3-hexaprényl-4-hydroxyphénol (4-HP) (Pierrel et al, 2010) (figure 22).

1.3. Le pABA et le 4-HB sont les précurseurs respectifs du 4-AP et du 4-HP

Etant donné que le pABA possède une structure très proche du 4-HB, avec un groupement amine remplaçant le groupement hydroxyle et que le pABA peut être prénylé par Coq2 (Alam et al, 1975), le pABA a été alors suspecté d'être le précurseur du 4-AP. En effet, l'accumulation de 4-AP augmente dans la souche Gal-YAH1 cultivée en YPD, lors de l'addition du pABA dans le milieu (figure 22), confirmant ainsi notre hypothèse, à savoir que le pABA est bien le précurseur du 4-AP.

Une expérience avec du pABA marqué au carbone 13 sur les 7 atomes de carbone (U- ^{13}C)-pABA) a été ensuite effectuée afin de tester si le pABA pouvait être un précurseur du

coenzyme Q₆. Une analyse en spectrométrie de masse du coenzyme Q₆ purifié à partir d'une souche WT cultivée dans un milieu supplémenté avec 2 mg/L U-(¹³C)-pABA a donné une masse m/z 597.4 correspondante au ¹³C₆-Q₆. Ce résultat a démontré que le noyau aromatique du pABA marqué était retrouvé dans le Q₆ synthétisé par une souche WT établissant ainsi que le pABA est un précurseur du coenzyme Q₆.

De plus, l'addition du 4-HB dans le milieu YPD, augmente l'accumulation de 4-HP et diminue le 4-AP dans la souche déplétée en Yah1 (figure 22) montrant ainsi que le 4-HB est le précurseur de 4-HP.

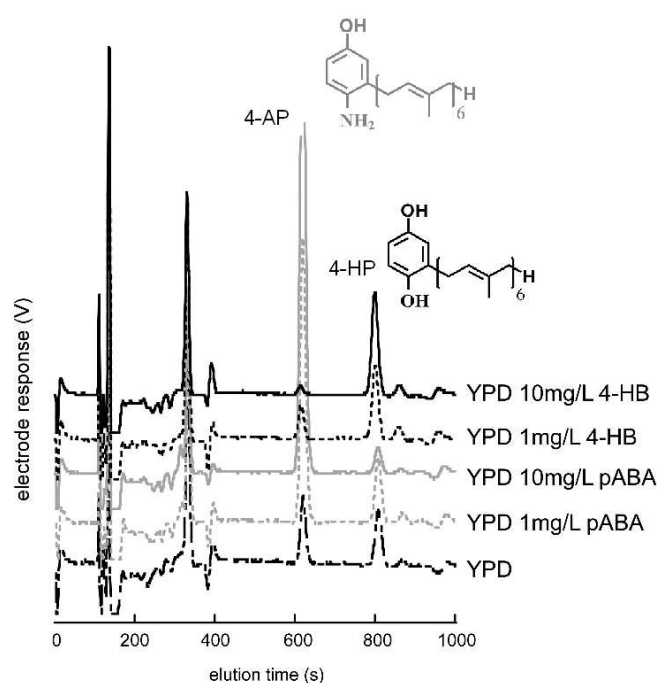


Figure 22: Accumulation de 4-AP et de 4-HP dans la souche déplétée en Yah1. 10 mg des cellules Gal-YAH1 cultivées pendant 18 heures dans YPD supplémenté ou non avec 1 ou 10 mg/L 4-HB ou pABA ont été extraites et analysées par HPLC-ECD. Le 4-AP élue à environ 610 s et le 4-HP à environ 800 s et leurs structures chimiques sont montrées.

Au vu des résultats décrits précédemment, l'accumulation de 4-AP et de 4-HP dans la souche déplétée en Yah1 reflète la compétition existante entre le pABA et le 4-HB au niveau de la prénylation par Coq2.

I.4. La formation de 4-AP et 4-HP résulte d'un déficit de l'hydroxylation en C5

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie montrent que la déplétion de Yah1 par culture de la souche Gal-YAH1 en glucose entraîne l'accumulation de 4-AP et de 4-HP. Clairement, ces intermédiaires accumulés présentent un défaut d'hydroxylation en C5 et de méthylation en O5. L'absence d'hydroxylation en C5 bloque la réaction de méthylation en O5 catalysée par Coq3 ainsi que celle en C2 catalysée par Coq5. L'absence de méthylation en C2 peut être expliquée par le fait que C2 sera insuffisamment enrichi en électrons pour une attaque nucléophile efficace sur le groupe méthyle de la SAM en l'absence d'un groupement méthoxyle électrodonneur en C5.

La formation de 4-AP et 4-HP provient de la décarboxylation en C1 et de l'hydroxylation en C1 du HAB et du HHB (figure 23). Selon l'enchaînement des étapes de biosynthèse proposées dans la souche WT, la première étape déficiente pour expliquer la formation de 4-AP et 4-HP est donc l'hydroxylation en C5.

Ainsi, l'absence de Yah1 entraîne un défaut d'hydroxylation en C5 dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ (figure 23).

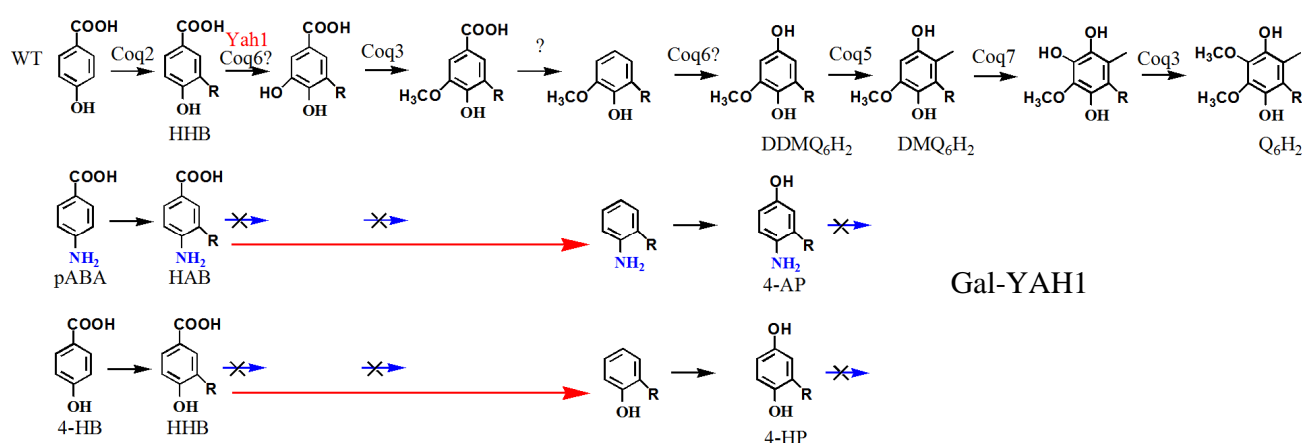


Figure 23: Schéma linéaire de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ montrant l'implication de Yah1 dans la réaction d'hydroxylation en C5. 4-HP: acide 3-hexaprényl-4-hydroxyphénol; 4-AP: acide 3-hexaprényl-4-aminophénol; HAB: acide 3-hexaprényl-4-aminobenzoïque; HHB: Acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque; DDMQ₆H₂: déméthyl-déméthoxyubiquinol; DMQ₆H₂: déméthoxyubiquinol; Q₆H₂: ubiquinol; R: chaîne polysoprényle.

I.5. Les précurseurs endogènes sont limitants pour la biosynthèse de Q_6

Le milieu minimum synthétique utilisé pour cultiver *S. cerevisiae* (YNB*) contient du pABA qui est un précurseur de biosynthèse du coenzyme Q_6 (Marbois et al, 2010; Pierrel et al, 2010). Dans l'objectif de contrôler la nature des précurseurs utilisés pour la biosynthèse du coenzyme Q_6 , nous avons utilisé un milieu synthétique sans pABA (YNB-P) pour la suite de nos expériences.

La détection électrochimique des extraits lipidiques cellulaires séparés par HPLC a révélé que l'addition du pABA ou du 4-HB au milieu YNB-P augmente le contenu cellulaire en coenzyme Q_6 et en DMQ_6 (figure 24). Ce résultat est compatible avec l'idée que le 4-HB endogène est limitant pour la biosynthèse du coenzyme Q_6 (Pierrel et al, 2010).

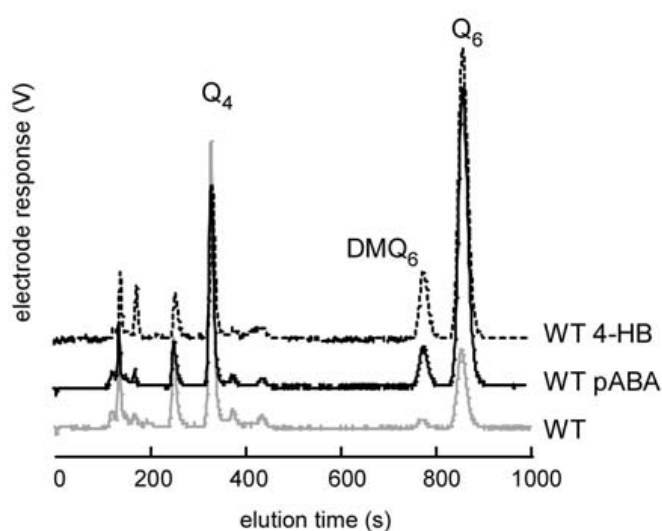


Figure 24: Le 4-HB endogène est limitant pour la biosynthèse du coenzyme Q_6 . La souche WT a été cultivée en YNB-P 2% glucose contenant ou non 100 μ M 4-HB ou 100 μ M pABA. Les extraits lipidiques de 2 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

II. Coq6 est l'hydroxylase C5 de la voie de biosynthèse du coenzyme Q_6

Coq6 est une protéine essentielle pour la biosynthèse du coenzyme Q_6 (Gin et al, 2003) qui possède trois régions conservées caractéristiques de la famille des hydroxylases à flavine

suggérant ainsi qu'elle contient un cofacteur FAD (van Berkel et al, 2006). Ainsi, Coq6 a été considérée comme étant l'enzyme catalysant l'hydroxylation en C5 et/ou C1 (Gin et al, 2003) (figure 23). Cette ambiguïté n'a pas été résolue à cause du manque d'accumulation d'intermédiaires dans le mutant $\Delta coq6$. En effet, $\Delta coq6$, comme la plupart des autres mutant Δcoq , accumule le HHB, un intermédiaire précoce de la voie de biosynthèse de Q₆. Le HHB n'apporte donc aucune information quant à l'étape de biosynthèse déficiente dans le mutant $\Delta coq6$.

II.1. Le mutant $\Delta coq6/Coq8$ accumule le 4-AP et le 4-HP

Il a été publié que la surexpression de Coq8 dans le mutant $\Delta coq7$ entraîne l'accumulation de la DMQ₆ (Padilla et al, 2009), le substrat de Coq7, suggérant ainsi que les protéines en amont de Coq7 sont stables et actives. Nous avons voulu surexprimer Coq8 dans le mutant $\Delta coq6$. En effet, la surexpression de Coq8 entraîne la stabilisation des protéines Coq qui sont normalement dégradées dans la souche $\Delta coq6$ (voir Chapitre II). La surexpression de Coq8 dans le mutant $\Delta coq6$ entraîne l'accumulation de 4-AP ou de 4-HP en présence du pABA ou du 4-HB respectivement (figure 25). Aucun composé électroactif n'est accumulé dans le mutant $\Delta coq6$ sans surexpression de Coq8 (figure 25). Les identités de 4-AP et de 4-HP ont été établies précédemment par Pierrel et coll. en 2010 (Voir I) et confirmées ici par des expériences d'HPLC (vérification des temps de rétention de chaque composé accumulé), de spectroscopie UV-visible (figure 26) ainsi que de spectrométrie de masse couplée à l'HPLC avec la détection des transitions ion moléculaire/ion tropylium en mode MRM (518.3/122 pour le AP et 519.3/123) (résultats non montrés).

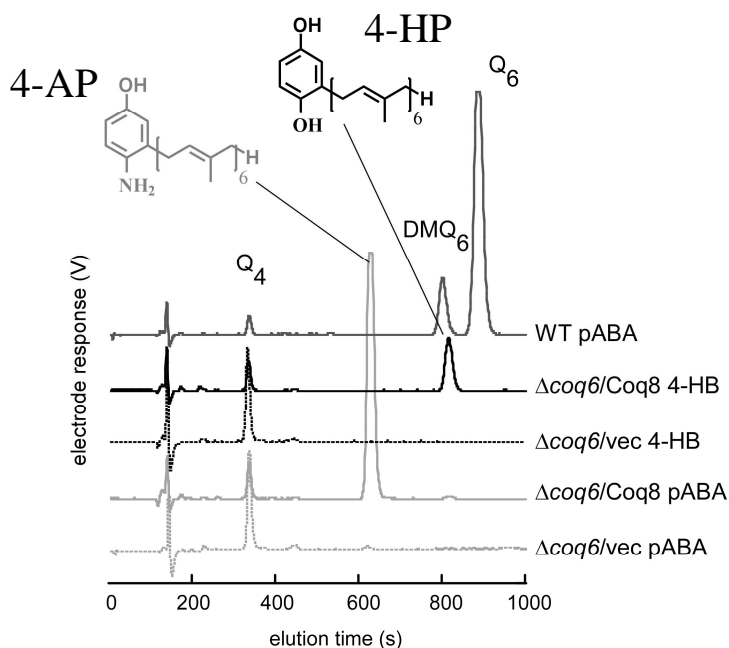


Figure 25: Le mutant $\Delta coq6/Coq8$ accumule le 4-AP et le 4-HP. La souche WT et le mutant $\Delta coq6$ transformé avec un vecteur vide (vec) ou avec un vecteur codant pour Coq8 ont été cultivées en YNB-P 2% glucose contenant ou non 100 μ M 4-HB ou 100 μ M pABA. Les extraits lipidiques de 1 mg de cellules (WT), 4 mg de cellules ($\Delta coq6/Coq8$), ou 8 mg de cellules ($\Delta coq6/vec$) ont été analysés par HPLC-ECD. Les structures chimiques du 3-hexaprényl-4-aminophénol (4-AP, en éluant à 610 s) et de 3-hexaprényl-4-hydroxyphénol (4-HP, en éluant à 810 s) sont montrées.

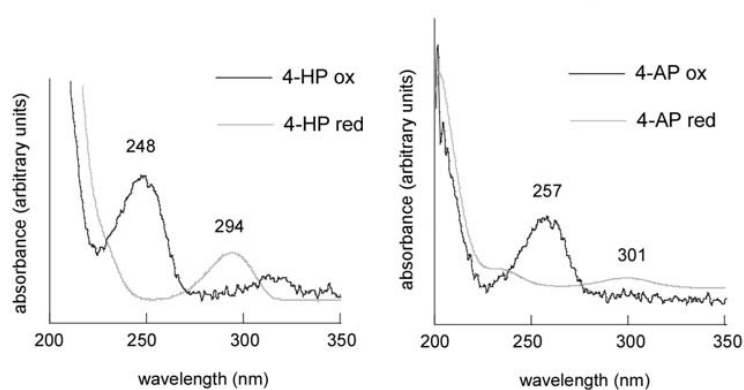


Figure 26: Spectres UV-visible du 4-AP et du 4-HP purifiés sous les formes oxydées et réduites. Les produits purifiés ont été injectés sur la colonne de HPLC avec un potentiel de l'électrode de la précolonne fixé à +550 mV (ox) ou -500mV (red).

II.2. Des mutations ponctuelles dans Coq6 inactivent la protéine et entraînent l'accumulation du 4-AP et 4-HP

Il a été montré en 1996 par Marbois et coll., qu'une souche exprimant le mutant ponctuel G65D de Coq7 ne synthétise pas de Q₆ et accumule de la DMQ₆ en plus du HHB (Marbois & Clarke, 1996). Ceci montre que, contrairement à la délétion du gène COQ7, l'introduction d'une mutation ponctuelle dans la protéine Coq7 permet de conserver l'activité des protéines Coq en amont de Coq7 ce qui implique que ces protéines ne sont pas dégradées.

II.2.a. Introduction des mutations dans Coq6

Etant donné que Coq6 contient des motifs de mono-oxygénases à flavine (figure 16), nous avons décidé de muter quelques résidus conservés de Coq6 (G202V, G386A et N388D) qui sont proposés pour être impliqués dans la liaison au NAD(P)H et au FAD dans la parahydroxybenzoate hydroxylase (PobA) (Eppink et al, 1997; Palfey et al, 1994) (figure 27). Les plasmides COQ6-G202V et COQ6-G386AN388D ont été construits par mutagenèse dirigée par PCR (Voir oligonucléotides, Matériels et Méthodes A.V.2).

Coq6	MFFSKVMLTRRILVRGLATAKSSAPKLTVDLIVGGGPAGLTLAASIKNSPQLKDLKTTLV	60
UbiH	-----MSVIVGGGMAGATLALAI SR-----LSHGAL	27
PobA	-----MKTQVAIIGAGPSGLLLGQLLHK-----AGI	26
Kmo	-----MDSSVIQRKKVAVIGGGLVGSQACFLAKR-----NFQI	34
	. * : : * . * . : . :	
Coq6	DMVDLKDKLSDFYNSPPDYFTNRI SVSITPRSIHFLENNAGATLMHDRIQSYDG-LYVTDG	119
UbiH	PVHLIEATAPESHAPG--FDGRAIALAAGTCQQLARIGVWQSLADCATAITT-VHVSDR	84
PobA	DNVILERQTPDYVLGRI----RAGVLEQGMVDLLREAGVDRRMARDGLVHEG-VEIAFA	80
Kmo	DVYEAREDTRVATFTRG---RSINLALSHRGRQALKAVGLEDQIVSQGIPMRARMIHSL	91
	. : . * . : . :	
Coq6	CSKATLDLARDS-MLCMIEIINI QASLYNRISQYDSKKDSIDI IDNTKVVN IKHSDPNDP	178
UbiH	GHAGFVTLAEDYQLAALGQVVELHNVGQRLFALLRKAPGVTLHCPDRVANVAR-----T	139
PobA	GQRRRIDLKRLS--GGKTVTVYGQTEVTRDLMEAREACGATTVYQAAEVRLHDLQ-----	133
Kmo	GKKSAIPYGTGS----QYILSVSRENLNKDLLTAAEKYPNVKMHFNHRLKCNPE-----	142
	: . : . : . :	
Coq6	LSWPLVTLS-NGE--VYKTRLLVGADLFNSPTRRFSQIPSRGWMYNAYGVVASMKLEYPP	235
UbiH	QSHVEVTLE-SGE--TLTGRVLVAADTHSALATACGVDWQQEPYEQ LAVIANVATS-VA	195
PobA	GERPYVTFERDGERLRRLDCDYIAGCDLFHG-ISRQSI PAERLKVFERVYPFGWLGLLADT	192
Kmo	-EGMITVLGSDKVPKDVTCDLIVGCDL AYSTVRSHLMKKPRFDYSQQYIPHG YMELTIPP	201
	. . . : . : . . * . : : . : . :	
Coq6	FKLR----GWQRF LPTGP IAHLPMPENNATLVWSSSERLSRLLLSLPPESTALINA AF	290
UbiH	HEGR-----AFERFTQHGPLAMLPMDSGRCSLVWCHPLERREEVLSWSDEKFCRELQSAF	250
PobA	PPVS-----HELIYANHPRGFALCSQRSATRSRYVQVPLSEKVEDWSDERFWTELKARL	247
Kmo	KNGDYAMEPNYLHIWPRNTFMMIALPNMKNKSFCTCTLFMPFEFEFEKLLTSNDVVDFQKYF	261

	:	.	.	:	.	:	:	:
Coq6	VLEDADMNYYYRTLEDGSMDDTKLIEDIKFRTEEIYATLKDESDIDEIYPPRVVSIIDKT	350						
UbiH	GWRLGKITHAGK-----	262						
PobA	PSEVAEKLVTGPS-----LE	262						
Kmo	PDAIPLIGEKLVLVD-----FFLL	280						
Coq6	RARFPLKLTHADRYCTDRVALVGDAHTTHPLAGQGLNMGQTDVHGLVYALEKAM----	405						
UbiH	RSAYPLALTHAARSITHRTVLVGNAAQTLHPHAGQCFNLGMRDVMSLAETLTQAQ----	317						
PobA	KSIAPLRSFVVEPMQHGRFLAGDAAHIVPPTGAKGLNLAASDVSTLYRLLKAY----	317						
Kmo	PAQPMISVKCSSPFHFKSHCVLLGDAAHAIVPFFGQGMNAGFEDCLVFDELMDKFSNDLSL	340						
	: : : * *: *: * . *: * . * : : :							
Coq6	-----ERGLDIGSSLSLEPFWAERYPSN-----NVL	431						
UbiH	-----ERGEDMGDYGVLCRYQQRRQSDR-----EAT	343						
PobA	-----REGRGE-LLERYSAICLRRIWKA-----ERF	342						
Kmo	CLPVFSRLRIPDDHAISDLSMYNIEMRAHVNSWFIQKNMERFLHAIMPSTFIPLYTM	400						
Coq6	LGMAADKLFKLYHTNFPPVVALRTFGLNLTNKGPKVKNMIIDTLGGNEK-----	479						
UbiH	IGVTDSLVLHFLANRWAPLVVGRNIGLMTMELFTPARDVVAQRTLGWVAR-----	392						
PobA	SWWMTSVLHRFPDTPDAFSQRIQQTELEYLGLSEAGLATIAENYVGLPYEEIE-----	394						
Kmo	VTFSRIRYHEAVQRWHWQKKVINKGLFGLSLIAISSTYLLIHYSRPSRFLRLRRPWNWI	460						
	: *							
Coq6	-----							
UbiH	-----							
PobA	-----							
Kmo	AHFRNTTCFPAKAVDSLEQISNLISR	486						

Figure 27: Alignement de séquences des différentes classes des mono-oxygénases à flavine.

L'alignement a été généré avec ClustalW2. Les mono-oxygénases sont: Coq6 de *S. cerevisiae*, UbiH d'*E. coli*, PobA de *Pseudomonas aeruginosa* et la kynurénine 3-mono-oxygénase (Kmo) d'*Homo sapiens*. Les résidus conservés mutés dans Coq6 (G202, G386 et N388) sont mis en évidence. Le motif DG (D201, G202 dans Coq6) a été proposé pour lier les groupements pyrophosphate du FAD et du NADPH chez PobA (Eppink et al, 1997) alors que le N300 de PobA est en contact avec l'anneau isoalloxazine du FAD (Palfey et al, 1994).

II.2.b. Les mutants ponctuels coq6 sont inactifs

S. cerevisiae produit de l'énergie sous forme d'ATP de deux manières différentes. Elle réalise une fermentation en présence d'une source de carbone fermentable comme le glucose (Glu), ou une respiration en présence d'une source de carbone non fermentable comme le lactate-glycérol (LG) ou l'éthanol. La respiration nécessite une chaîne respiratoire fonctionnelle pour laquelle la présence du coenzyme Q₆ est indispensable. Une expérience de dilution en série a été effectuée sur milieu respiratoire (LG) et sur glucose (Glu) (figure 28) pour tester *in vivo* la fonctionnalité des mutants ponctuels *coq6*. Toutes les souches poussent sur milieu non respiratoire (Glu) (figure 28). Le plasmide contenant le gène COQ6 permet de rétablir la

croissance sur LG de la souche $\Delta coq6$ à la différence d'un plasmide vide ou des plasmides Coq6-G202V et Coq6-G386A N388D (figure 28).

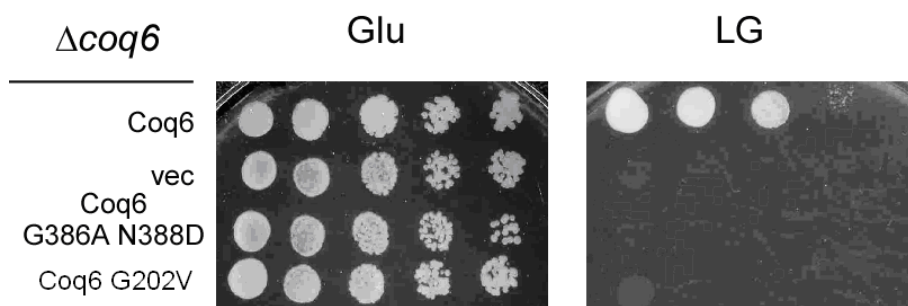


Figure 28: Expérience de dilution en série montrant l'incapacité des mutants ponctuels *coq6* à pousser sur milieu respiratoire. La souche $\Delta coq6$ transformée, soit avec un vecteur vide (vec) ou avec des vecteurs contenant le gène COQ6, Coq6-G386A-N388D ou Coq6-G202V a été cultivée en YNB-P 2% glucose pendant 24 heures. Après rinçage des cellules avec de l'eau distillée, des dilutions en série ont été déposées sur des boîtes de gélose. Les boîtes contiennent de l'YNB-P-agar supplémenté avec 2% de glucose (Glu) ou de 2% de lactate-glycérol (LG). Les boîtes ont été incubées pendant 2 jours (Glu) ou 4 jours (LG) à 30°C.

Ce résultat suggère que les mutations G202V et G386A N388D inactivent Coq6 et que ces protéines rendues non fonctionnelles ne permettent pas de rétablir la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans la souche $\Delta coq6$.

Afin de confirmer ce résultat, nous avons mesuré le contenu en coenzyme Q₆ des différents transformants $\Delta coq6$.

II.2.c. Accumulation de 4-AP et de 4-HP dans les mutants ponctuels *coq6*

Comme attendu, un vecteur contenant le gène COQ6 rétablit la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans la souche $\Delta coq6$ (figure 29). L'absence de synthèse de coenzyme Q₆ et de la DMQ₆ dans la souche $\Delta coq6$ contenant les vecteurs exprimant les allèles G202A et G386A-N388D prouvent que ces mutants *coq6* sont inactifs (figure 29A et B). En revanche, on constate pour ces mutants une accumulation de 4-AP lors d'une culture en présence du pABA et de 4-HP en présence du 4-HB (figure 29A et B).

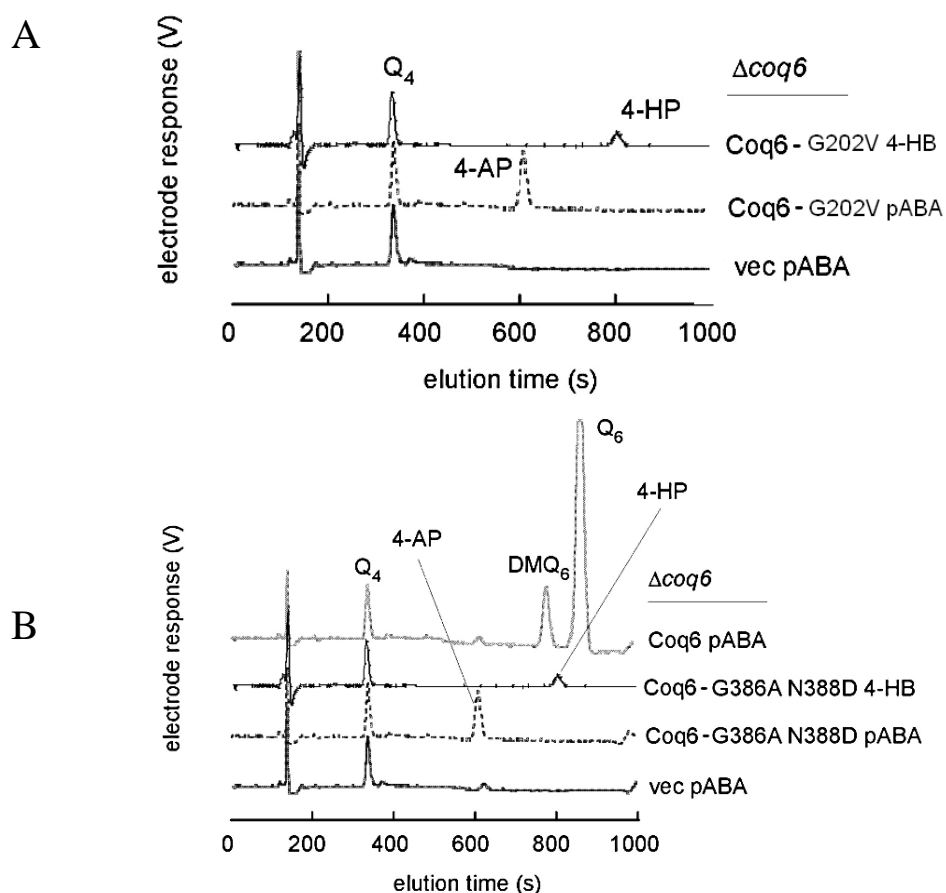


Figure 29: Accumulation de 4-AP et de 4-HP dans les mutants ponctuels *coq6*. La souche $\Delta coq6$ transformée avec un vecteur vide (vec) ou des vecteurs exprimant soit Coq6-G202V (A), Coq6 ou Coq6-G386A-N388D (B) a été cultivée en YNB-P 2% glucose contenant 100 μ M pABA ou 100 μ M 4-HB. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

L'ensemble des résultats de la partie II montrent que l'inactivation de Coq6 par des mutations ponctuelles ou la délétion du gène codant pour cette protéine accompagnée de la surexpression du gène COQ8 entraîne l'accumulation de 4-AP et 4-HP. Clairement, le 4-AP et le 4-HP résultent de la prénylation du pABA et du 4-HB par Coq2. Cependant, les étapes d'hydroxylation en C5 et de méthylation en O5 ne sont pas catalysées en absence de l'activité de Coq6, par contre, le HHB et le HAB ont directement subi une décarboxylation et une hydroxylation en C1 (figure 30). Ainsi, comme exposé précédemment pour les cellules déplétées en Yah1, l'étape déficiente dans les souches inactivées pour Coq6 est celle de l'hydroxylation en C5. Le fait que 4-HP et 4-AP accumulés dans les mutants *coq6* contiennent l'hydroxyle en C1

mais pas l'hydroxyle en C5 (figure 30) démontre que Coq6 est uniquement impliquée dans l'hydroxylation en C5 de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ et qu'elle ne joue aucun rôle dans l'hydroxylation en C1 (figure 30).

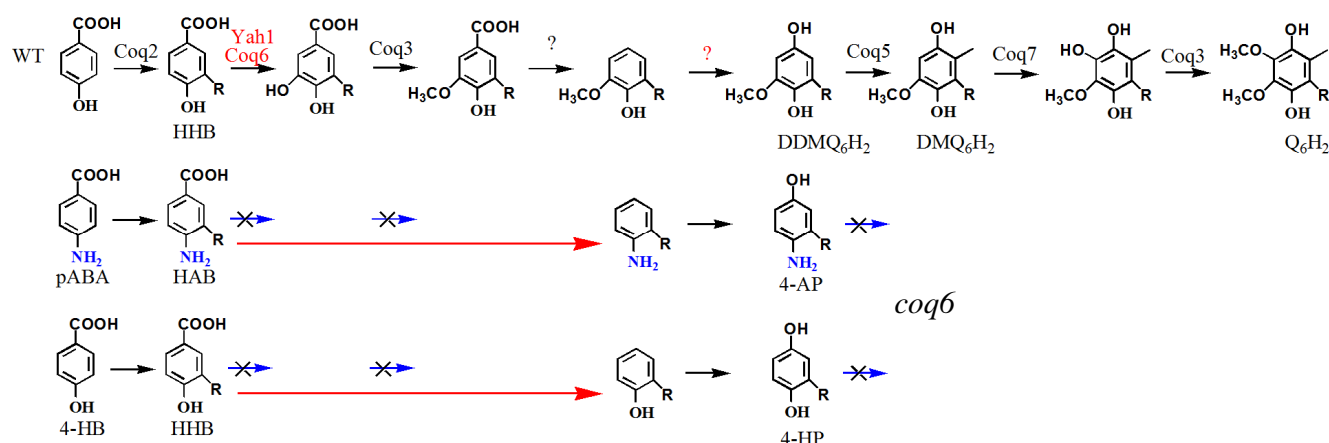


Figure 30: Schéma linéaire de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ montrant l'implication de Coq6 dans la réaction d'hydroxylation en C5. 4-HP: acide 3-hexaprényl-4-hydroxyphénol; 4-AP: acide 3-hexaprényl-4-aminophénol; HAB: acide 3-hexaprényl-4-aminobenzoïque; HHB: Acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque; DDMQ₆H₂: déméthyl-déméthoxyubiquinol; DMQ₆H₂: déméthoxyubiquinol; Q₆H₂: ubiquinol; R: chaîne polysoprényle.

III. La perturbation du contenu mitochondrial en FAD entraîne l'accumulation de 4-AP et de 4-HP

Coq6 a été prédite comme étant une mono-oxygénase à flavine (Gin et al, 2003; van Berkel et al, 2006); nous avons voulu vérifier que l'hydroxylation en C5 que nous proposons être catalysée par Coq6, est bien dépendante du contenu mitochondrial en FAD.

*III.1. Le mutant *Aflx1* accumule les mêmes intermédiaires que ceux accumulés dans les mutants *coq6**

En 2004, Bafunno et coll. ont montré que le FAD peut-être synthétisé à la fois dans le cytosol mais aussi dans la mitochondrie (Bafunno et al, 2004). En conséquence, les pools de FAD cytosoliques et mitochondriaux sont partiellement indépendants et un déficit mitochondrial en FAD ne résulte pas forcément d'un défaut cytosolique (Bafunno et al, 2004).

Par ailleurs, la délétion du gène FLX1 qui code pour un transporteur mitochondrial du FAD provoque une diminution de l'activité enzymatique mitochondriale des protéines dépendantes du FAD telles que la succinate déshydrogénase (SDH) et la lipoamide déshydrogénase (DLD) (Bafunno et al, 2004; Tzagoloff et al, 1996).

La souche $\Delta flx1$ montre clairement une diminution du niveau du coenzyme Q₆ et une accumulation de 4-AP et de 4-HP quand la souche est cultivée en présence du pABA et 4-HB, respectivement (figure 31). Ainsi, la diminution du contenu mitochondrial en FAD affecte la biosynthèse du coenzyme Q₆ et entraîne l'accumulation d'intermédiaires caractéristiques d'une déficience pour l'hydroxylation en C5.

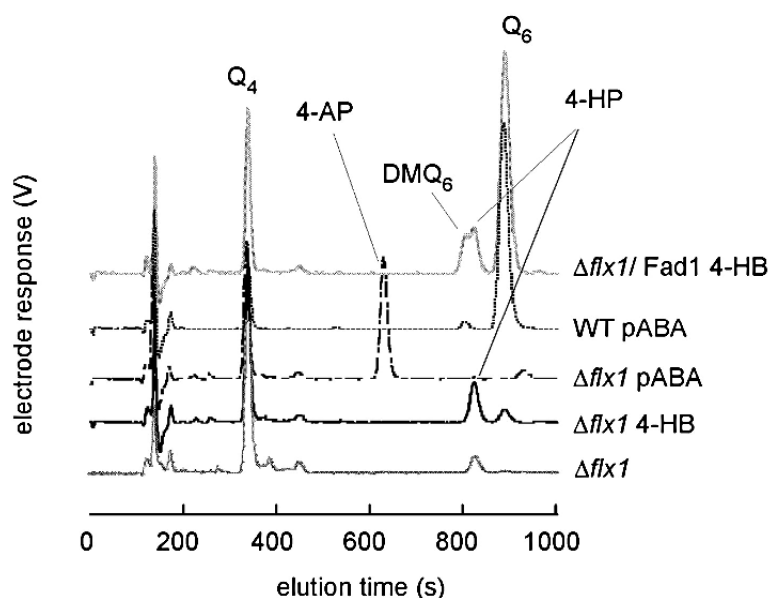


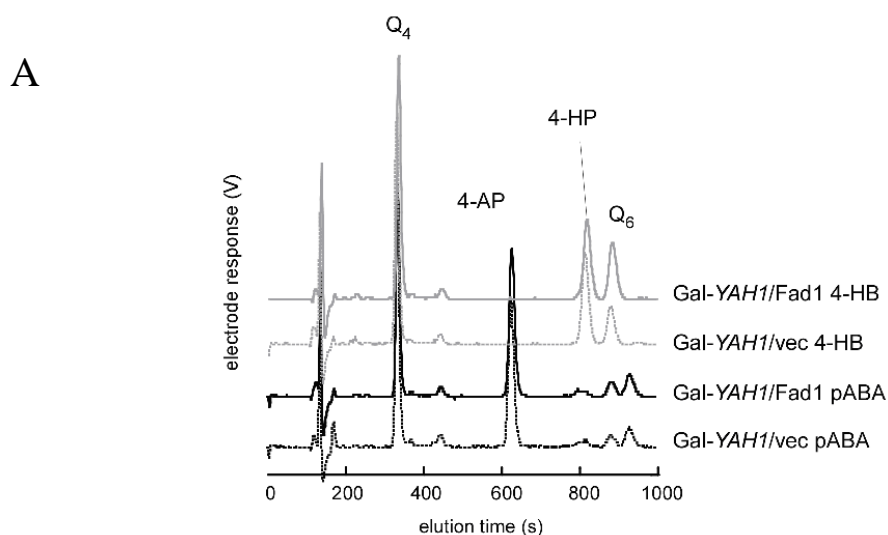
Figure 31: Le mutant $\Delta flx1$ accumule le 4-AP et le 4-HP et la surexpression du gène FAD1 rétablit la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans ce mutant. La souche WT et le mutant $\Delta flx1$ transformé ou non avec un vecteur contenant FAD1 ont été cultivés en YNB-P 2% glucose supplémenté ou non avec du pABA ou

du 4-HB à 100 μ M. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ($\Delta flx1$) et 1 mg de WT ont été analysés par HPLC-ECD.

III.2. La surexpression du gène *FAD1* rétablit la biosynthèse du coenzyme Q_6 dans $\Delta flx1$ mais pas dans les mutants *coq6* et la souche Gal-YAH1

Il a été décrit que la surexpression du gène *FAD1*, qui code pour la flavine adenine dinucléotide synthétase, une enzyme cytosolique, complémente partiellement le déficit en FAD mitochondrial dans la souche $\Delta flx1$ (Wu et al, 1995).

Nous avons donc surexprimé *FAD1* dans les différents mutants déficitaires pour l'hydroxylation en C5. Nous avons observé que la surexpression du gène *FAD1* rétablit la biosynthèse du coenzyme Q_6 dans la souche $\Delta flx1$ mais sans abolir complètement la formation de 4-HP (figure 31). Ce résultat est en accord avec la complémentation partielle du déficit mitochondrial en FAD dans la souche $\Delta flx1$ (Wu et al, 1995). Par contre aucun effet n'a été observé sur le contenu en coenzyme Q_6 des cellules Gal-YAH1 (figure 32A) et du mutant $\Delta coq6/Coq8$ (figure 32B) après surexpression du gène *FAD1*.



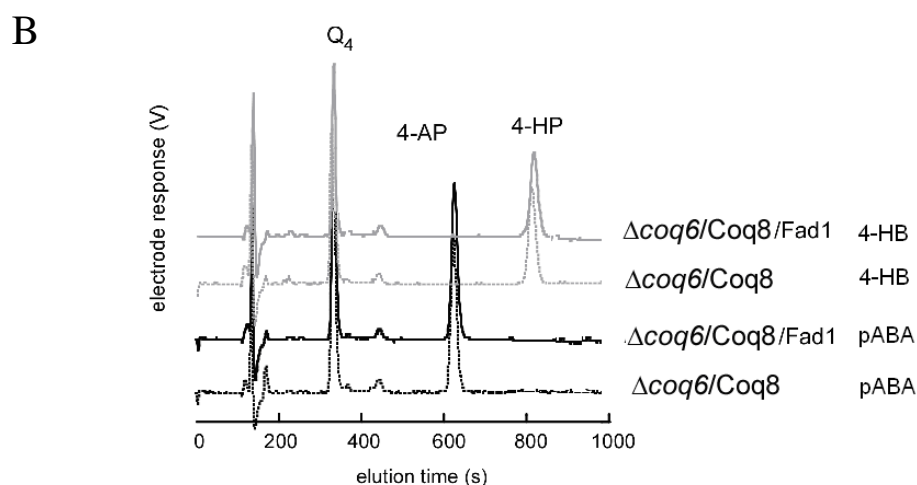


Figure 32: Absence d'effet de la surexpression du gène FAD1 dans la souche déplétée en Yah1 et dans le mutant $\Delta coq6/Coq8$. Les cellules Gal-YAH1 (A) et $\Delta coq6/Coq8$ (B) transformées ou non avec FAD1 ont été cultivées en YNB-P 2% glucose supplémenté avec du pABA ou de 4-HB à 100 μ M. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

Collectivement, nos résultats montrent que le déficit mitochondrial en FAD entraîne l'accumulation de 4-AP et 4-HP. En effet, ces intermédiaires possèdent un hydroxyle en C1 mais pas en C5. Ceci montre que l'hydroxylation en C5 de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ est dépendante du contenu mitochondrial en FAD ce qui est en accord avec notre proposition que Coq6 catalyse cette hydroxylation et suggère que l'hydroxylation C1 n'est pas catalysée par une enzyme dépendante du FAD.

IV. L'ajout d'analogues de 4-HB hydroxylés ou méthoxylés en C5, rétablit la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans les souches Gal-YAH1, *coq6* et $\Delta flx1$

Nous avons ensuite vérifié si la forme hydroxylée du 4-HB, l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque (3,4-diHB) ou la forme méthoxylée, l'acide vanillique (VA) peuvent entrer dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ et par conséquent court-circuiter une déficience de l'étape d'hydroxylation en C5.

IV.1. Restauration de la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans les souches Gal-YAH1, *coq6* et *Δflx1*.

L'ajout du 3,4-diHB ou de VA au milieu de culture permet de rétablir la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans la souche $\Delta coq6$ /Coq8 (figure 33A) et dans les mutants ponctuels *coq6*. (figure 33B). De plus, ce rétablissement de la biosynthèse du coenzyme Q₆ est dose-dépendante, en augmentant la concentration de VA (de 0.1 mM à 0.5 mM), la quantité de coenzyme Q₆ synthétisé augmente également (figure 33). La capacité des analogues du 4-HB hydroxylé (3,4-diHB) ou méthoxylé (VA) en C5 à rétablir efficacement la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans les mutants *coq6* prouve que c'est uniquement l'étape d'hydroxylation en C5 qui est limitante dans ces mutants.

La souche $\Delta coq6$ contenant seulement un vecteur vide (sans Coq8) ne synthétise pas du coenzyme Q₆ à partir de VA (données non présentées) montrant ainsi que l'intégrité du complexe de biosynthèse du coenzyme Q₆ (voir Chapitre II) est nécessaire pour la conversion du VA en coenzyme Q₆.

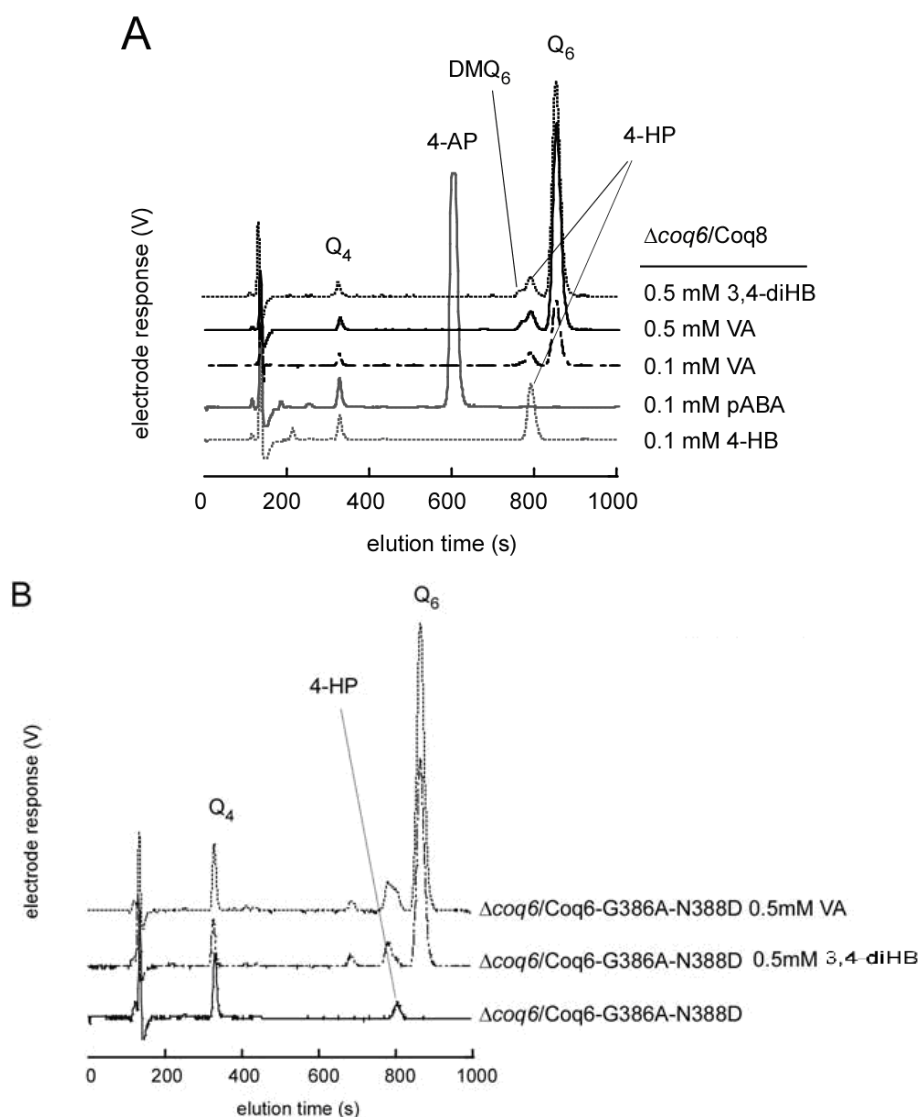


Figure 33: VA et 3,4-diHB rétablissent la biosynthèse de Q₆ dans les mutants *coq6*. A) Le mutant $\Delta coq6/Coq8$ a été cultivé en YNB-P 2% glucose contenant les concentrations indiquées de 4-HB, pABA, 3,4-diHB ou VA. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD. B) La souche $\Delta coq6/Coq6-G386A-N388D$ a été cultivée en YNB-P 2% glucose contenant ou non les concentrations indiquées de VA et 3,4-diHB. Les extraits lipidiques de 3 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

Le mutant $\Delta flx1$ et la souche déplétée en Yah1 sont, eux aussi, capables de synthétiser du coenzyme Q₆ à partir de VA ou de 3,4-diHB indiquant ainsi que c'est uniquement l'étape d'hydroxylation en C5 qui est limitante dans ces mutants (figure 34).

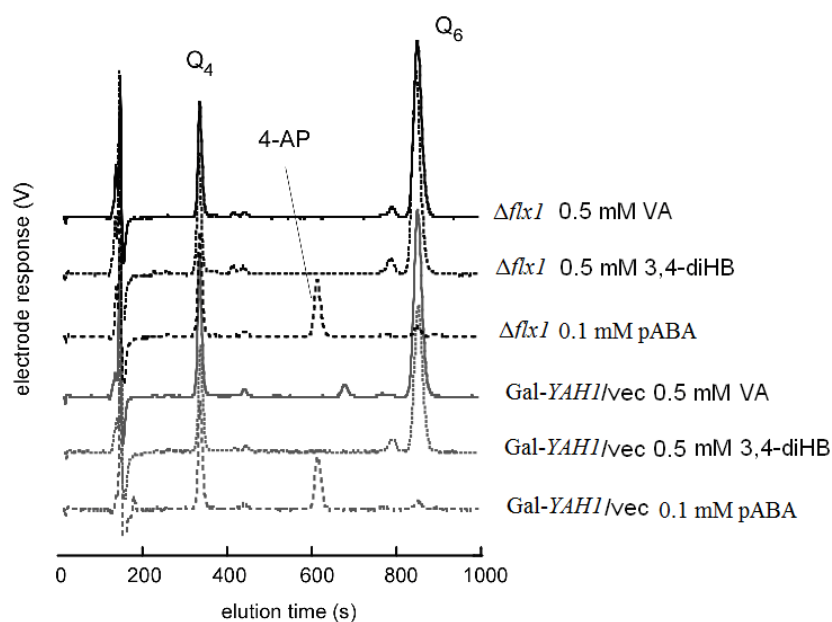


Figure 34: Les mutants $\Delta flx1$ et la souche Gal-YAH1 synthétisent du coenzyme Q_6 à partir de VA et 3,4 di-HB. Les cellules ont été cultivées en YNB-P 2% glucose contenant les concentrations indiquées du pABA, 4-HB, VA et 3,4-diHB. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

IV.2. Le coenzyme Q_6 synthétisé à partir de VA ou 3,4-diHB est fonctionnel dans la chaîne respiratoire

Nous nous sommes ensuite posé la question de la fonctionnalité respiratoire du coenzyme Q_6 synthétisé à partir de VA et du 3,4-diHB.

Comme le montre la figure 35, la souche $\Delta coq6$ surexprimant Coq8 ou Coq6-G386A-N388D est capable de croître sur un milieu respiratoire (contenant du LG ou de l'éthanol comme source de carbone) complété par l'ajout du 3,4-diHB ou de VA. De même, la souche $\Delta flx1$ pousse sur LG uniquement en présence de 3,4-diHB ou VA (figure 35). Ces résultats montrent donc que le coenzyme Q_6 synthétisé à partir de ces analogues de précurseur est physiologiquement fonctionnel. Cependant, en remplaçant le 3,4-diHB ou le VA par du pABA ou du 4-HB, ces mutants perdent leur capacité respiratoire (figure 35) révélant ainsi que le 4-AP ou le 4-HP synthétisés en présence du pABA et 4-HB respectivement ne sont pas capables de transférer efficacement les électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

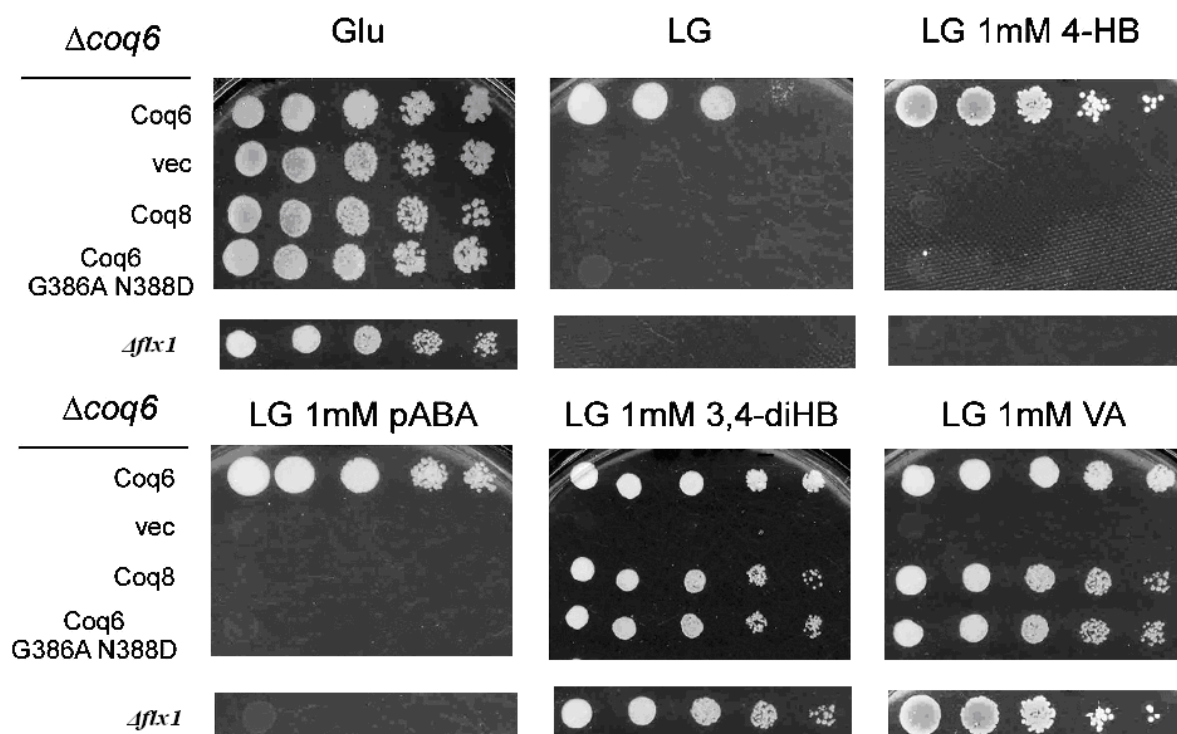


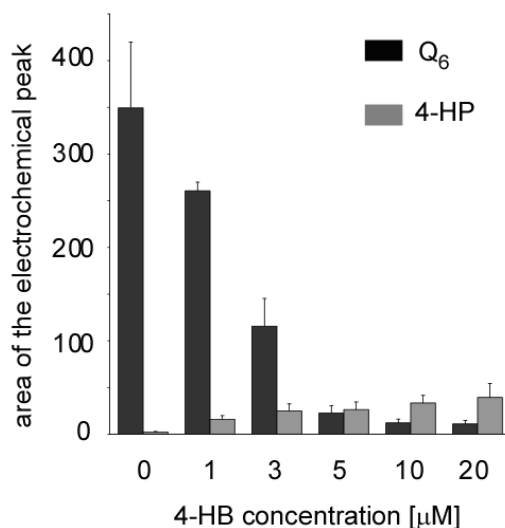
Figure 35: Expérience de dilution en série montrant la fonctionnalité du coenzyme Q₆ synthétisé à partir de VA dans les mutants *coq6* et $\Delta flx1$. Le mutant $\Delta flx1$ et le mutant $\Delta coq6$ transformé, soit avec un vecteur contenant COQ8, un vecteur vide (vec) ou avec le vecteur contenant Coq6-G386A-N388D ont été cultivés en YNB-P 2% glucose pendant 24 heures. Après rinçage des cellules avec de l'eau distillée, des dilutions en série ont été déposées sur des boîtes de gélose. Les boîtes contiennent de l'YNB-P-agar supplémenté avec 2% de glucose (Glu) ou de 2% de lactate-glycérol (LG) additionné des concentrations indiquées de VA, du pABA ou de 3,4-diHB. Les boîtes ont été incubées pendant 2 jours (Glu) ou 4 jours (LG) à 30°C.

IV.3. pABA et 4-HB sont des compétiteurs efficaces de l'entrée de VA dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆

La quantification du taux du coenzyme Q₆ et de 4-HP est réalisée par titration de doses croissantes de 4-HB dans le milieu de culture de la souche $\Delta coq6$ /Coq8 cultivée en présence d'1 mM VA. Dans ces conditions, on constate à la fois la diminution progressive du niveau de coenzyme Q₆ synthétisé et l'accumulation de 4-HP (figure 36A). De même, la titration du milieu contenant 1 mM VA par le pABA a un impact similaire sur le niveau du coenzyme Q₆ avec une apparition de 4-AP (figure 36B). Il est intéressant de noter que 5 μ M du pABA ou de 4-HB

suffisent à inhiber fortement la synthèse du coenzyme Q₆ obtenue avec 1 mM VA (figure 36). Nos résultats suggèrent ainsi que le pABA et le 4-HB exogènes entrent en compétition avec le VA au niveau de la prénylation par Coq2.

A



B

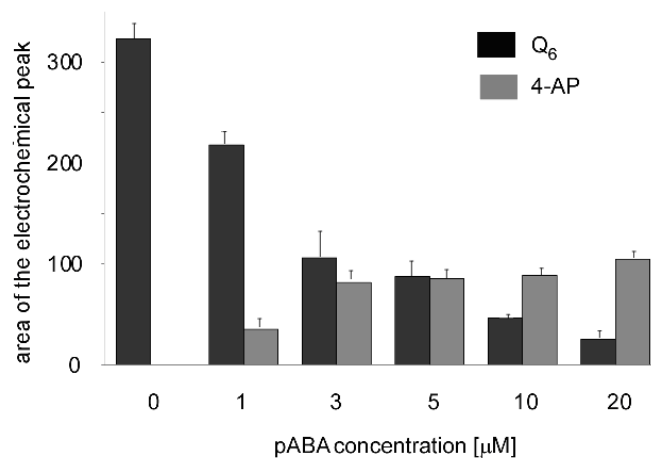


Figure 36: Compétition entre le 4-HB et pABA et le VA. Quantification du coenzyme Q₆, 4-HP (A) et 4-AP (B) formés dans le mutant $\Delta coq6/Coq8$ cultivé en YNB-P 2% glucose supplémenté avec 1 mM VA et les concentrations indiquées de 4-HB (A) et pABA (B). Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 2).

En conclusion de cette partie, nous avons démontré pour la première fois que l'emploi d'analogues synthétiques de 4-HB permet de rétablir *in vivo* la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans des mutants déficients pour l'hydroxylation en C5.

V. Relation entre Yah1 et Coq6

Nos résultats montrent que les phénotypes des cellules déplétées en Yah1 (Pierrel et al, 2010) ou des mutants *coq6* sont très similaires. En effet, selon sa séquence comportant des séquences signatures de mono-oxygénases à flavine et nos résultats, nous proposons que la mono-oxygénase Coq6 catalyse l'hydroxylation en C5. Par ailleurs, la déplétion de Yah1 ou de sa ferrédoxine réductase associée Arh1, entraîne une déficience de l'hydroxylation C5. Les expériences suivantes ont été conduites afin d'établir si Yah1 est impliquée directement dans la réaction d'hydroxylation en C5 ou si l'effet de la déplétion de Yah1 sur cette réaction est indirect.

V.1. Coq6 est stable en absence de Yah1

Nous avons voulu vérifier si la stabilité de la protéine Coq6 était affectée par l'absence de Yah1. Puisque nous n'avons pas d'anticorps anti-Coq6, nous avons utilisé une souche dans laquelle la protéine Coq6 a été étiquetée par trois séquences hémagglutinine (3HA) afin de pouvoir détecter la protéine Coq6-3HA grâce à un anticorps anti-HA.

V.1.a. Construction de la souche Gal-YAH1 COQ6-3HA

La souche Gal-YAH1 COQ6-3HA contient une insertion chromosomique d'une séquence codant pour le tag triple hémagglutinine (3HA) à l'extrémité 3' de COQ6 et elle permet la régulation de l'expression de Yah1 (Gal-YAH1). En fait, le tag 3HA a été amplifié par PCR à partir du plasmide pFA6a-3HA-HIS3MX6 (Longtine et al, 1998) avec de part et d'autre du tag HA des séquences nucléotidiques homologues aux séquences entourant le codon stop de l'ORF de COQ6. Cette cassette a été ensuite transformée dans une souche WT (W303) pour l'insérer par recombinaison homologue à l'extrémité 3' du gène COQ6 créant ainsi la version étiquetée

COQ6-3HA. Un croisement entre la souche COQ6-3HA et Gal-YAH1 a été ensuite effectué. Finalement, les diploïdes ont été sélectionnés, puis mis à sporuler et les tétrades formées ont ensuite été disséquées pour isoler la souche Gal-YAH1 COQ6-3HA haploïde.

V.1.b. Western-blot

La protéine Coq6-3HA a été détectée par western-blot à la taille attendue de 57 kDa dans les extraits cellulaires de la souche COQ6-3HA cultivée en glucose ou galactose mais pas dans la souche WT. Yah1 est détectée dans les souches WT et COQ6-3HA cultivées en glucose et en galactose par contre elle est uniquement détectée dans la souche Gal-YAH1 COQ6-3HA cultivée en galactose (figure 37). Ceci montre la déplétion efficace de Yah1 en glucose. Coq6 est détectée même en absence de Yah1 dans la souche Gal-YAH1 COQ6-3HA cultivée en glucose (figure 37) démontrant ainsi que la déplétion de Yah1 n'affecte pas la stabilité de Coq6.

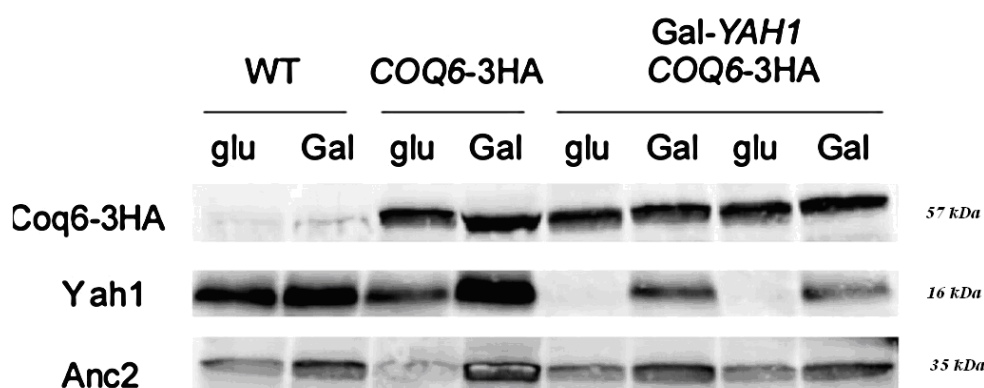


Figure 37: Etude de la stabilité de Coq6 en absence de Yah1 par western-blot. Les cellules WT, COQ6-3HA, et Gal-YAH1 COQ6-3HA (deux clones) ont été cultivées en YP contenant soit 2% de glucose (Glu) ou 2% de galactose (Gal). Coq6-3HA a été détectée à 57 kDa avec un anticorps anti-HA et comme prévu était absente dans les extraits de la souche WT. Yah1 a été détectée aux alentours de 16 kDa et Anc2, le transporteur ADP/ATP de la membrane mitochondriale interne servant comme contrôle de charge, à 35 kDa.

La présence de Coq6 dans la souche déplétée en Yah1 a été également indirectement confirmée par l'observation que l'ajout de VA ou du 3,4-diHB rétablit la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans la souche Gal-YAH1 même sans surexpression de Coq8 (figure 38) alors que ce n'est pas le cas dans la souche $\Delta coq6$. Ce résultat montre que le complexe protéique de biosynthèse du coenzyme Q₆ est stable et que donc Coq6 est présente.

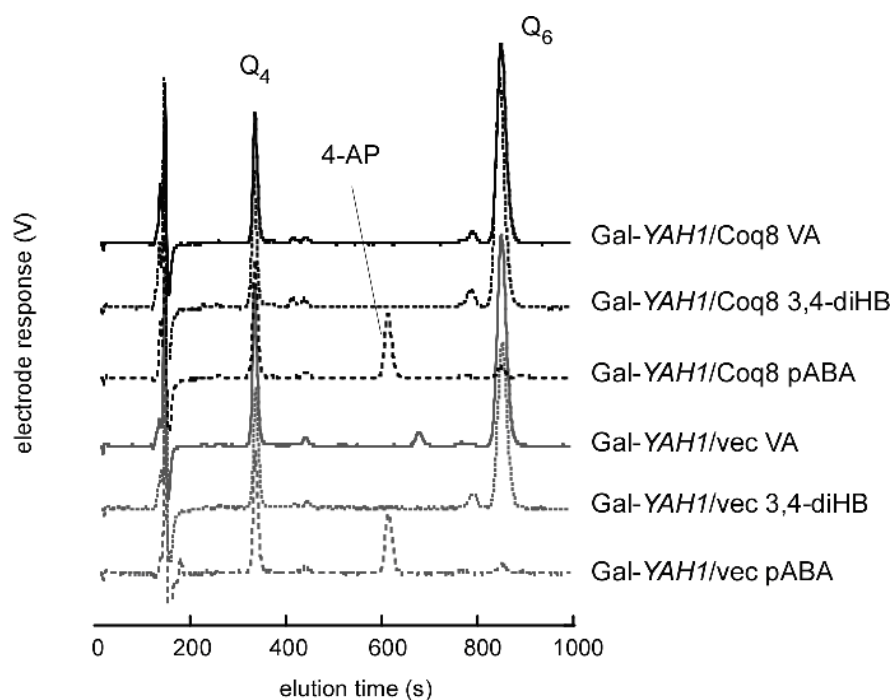


Figure 38: Absence d'effet de la surexpression de Coq8 dans la souche Gal-YAH1. La souche Gal-YAH1 transformée avec un vecteur vide (vec) ou avec un vecteur contenant COQ8 a été cultivée pendant 24 heures dans de l'YNB-P 2% glucose supplémenté par 0,1 mM pABA ou 1 mM 3,4-diHB ou 1 mM VA. Les extraits de 2 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

V.2. Les ferrédoxines humaines Fdx1 et Fdx2 ne complètent pas le défaut de biosynthèse du coenzyme Q_6 dans la souche déplétée en Yah1

Nos collaborateurs allemands ont montré en 2010 la complémentation du défaut de biosynthèse des centres [Fe – S] dans la souche déplétée en Yah1 par la surexpression de la ferrédoxine humaine Fdx2 mais pas par celle de la ferrédoxine humaine Fdx1 (Sheftel et al, 2010). Fdx1 est impliquée dans la synthèse des stéroïdes et la vitamine D (Sheftel et al, 2010). Il est important de dire que la biosynthèse des centres [Fe – S] est essentielle à la viabilité de *S. cerevisiae* et donc la souche Gal-YAH1 ne peut croître que sur un milieu contenant du galactose comme source de carbone. Dans nos expériences de déplétion de Yah1, la croissance des cellules Gal-YAH1 en glucose est possible grâce à la préculture en galactose et à la déplétion progressive du niveau de Yah1 lors de la transition en glucose.

D'une manière surprenante, aucun des deux homologues humains de Yah1, Fdx1 ou Fdx2, ne complémente le défaut de biosynthèse du coenzyme Q₆ dans la souche déplétée en Yah1. En effet, comme le montre l'électrochromatogramme dans la figure 39, les cellules Gal-YAH1/Fdx1 ou Gal-YAH1/Fdx2 présentent une faible quantité du coenzyme Q₆ et accumulent du 4-AP en présence du pABA (figure 39) ou du 4-HP en présence de 4-HB (données non présentées).

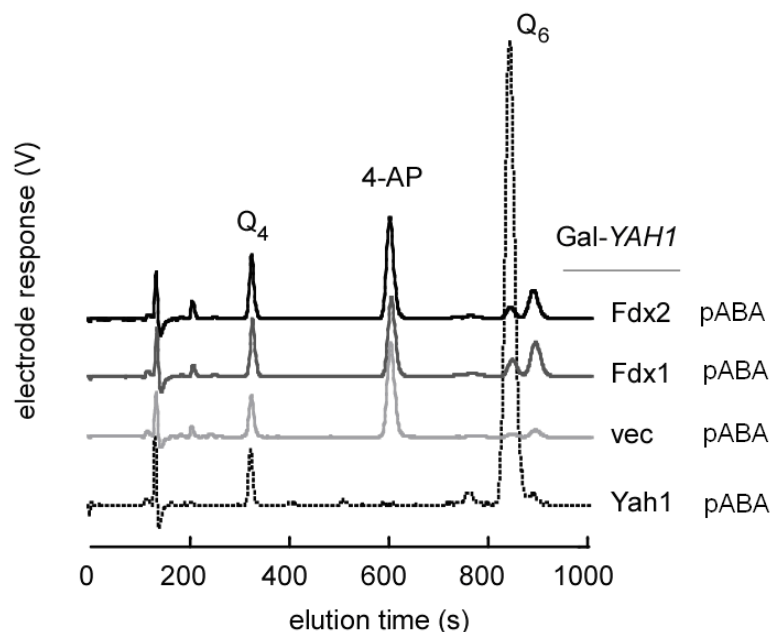


Figure 39: Absence d'effet de la surexpression des protéines Fdx1 et Fdx2 dans la souche Gal-YAH1. La souche Gal-YAH1 transformée avec un vecteur vide (vec), un vecteur contenant YAH1 ou des vecteurs contenant les gènes FDX1 ou FDX2 a été cultivée pendant 24 heures en YNB-P 2% glucose supplémenté par 0.1 mM pABA. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

La croissance de la souche Gal-YAH1 sur un milieu synthétique contenant une source de carbone non fermentable (Lactate) est limitée suite à la déplétion de la protéine Yah1 qui conduit à un défaut de biosynthèse du coenzyme Q₆ et de biosynthèse des centres [Fe – S]. On remarque que le défaut de biosynthèse des centres [Fe – S] est complété par la surexpression de Fdx2. En effet, la souche Gal-Yah1 exprimant cette protéine est ainsi capable de croître sur milieu non respiratoire (Glu) (figure 40). Ce défaut est aussi complété lors de la transformation de la souche Gal-YAH1 avec un plasmide contenant le gène YAH1 (figure 40). Cependant, la souche Gal-YAH1 transformée avec un plasmide exprimant Fdx2, ne montre une croissance sur milieu

respiratoire (Lac) qu'après l'addition de VA ou du 3,4-diHB (figure 40). Au contraire, l'ajout de 4-HB ou du pABA n'a aucun effet (figure 40, données non présentées).

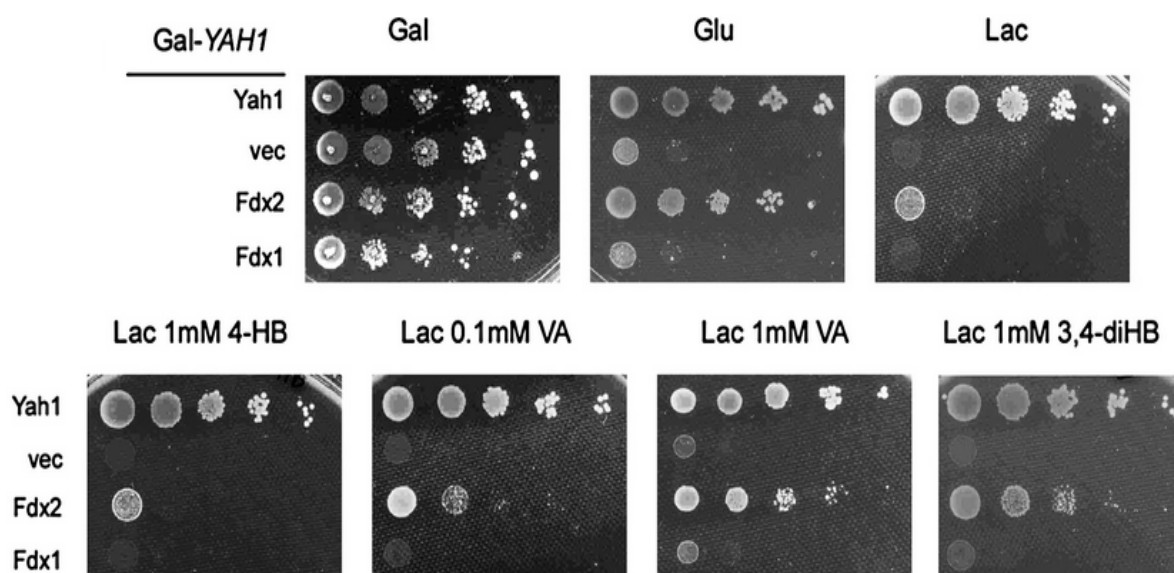


Figure 40: Le coenzyme Q₆ est limitant pour la croissance sur milieu respiratoire de la souche Gal-YAH1/Fdx2. La souche Gal-YAH1 transformée soit avec un vecteur vide (vec) soit avec des vecteurs contenant les gènes YAH1, FDX1 ou FDX2 a été cultivée en YNB-P 2% glucose pendant 24 heures. Après rinçage des cellules avec de l'eau distillée, des dilutions en série ont été déposées sur des boîtes de gélose. Ces boîtes contiennent de l'YNB-P-agar 2% glucose (Glu), 2% galactose (Gal), ou 2% lactate (Lac) supplémenté par les concentrations indiquées du VA, du 3,4-diHB, ou du 4-HB. Les boîtes ont été incubées pendant 2 jours (Glu) ou 4 jours (Gal et Lac) à 30°C.

Nos résultats suggèrent donc qu'en absence de VA ou du 3,4-diHB, le coenzyme Q₆ est limitant pour la croissance respiratoire de la souche Gal-YAH1/Fdx2. Ceci a été confirmé par la mesure *in vitro* de l'activité succinate déshydrogénase (SDH)-cytochrome c-oxydoréductase. En fait, la SDH est un complexe multiprotéique qui contient trois centres [Fe – S] et un cofacteur FAD, tous nécessaires pour son activité. Ces tests d'activité ont été effectués par nos collaborateurs allemands.

Comme prévu par la complémentation du défaut de biosynthèse des centres [Fe – S] des cellules Gal-YAH1 par Fdx2 (Sheftel et al, 2010), Fdx2 rétablit significativement mais pas au niveau WT

la réduction *in vitro* du dichlorophénolindophénol (DPIP) par la SDH dans les mitochondries des cellules déplétées pour Yah1 (figure 41).

Le coenzyme Q₆ est nécessaire pour transférer des électrons à partir de la SDH au cytochrome bc1 qui réduit le cytochrome c (cyt c). Fdx2 rétablit l'activité SDH-cytochrome c-réductase dans Gal-YAH1 uniquement lorsque les cellules ont été cultivées en présence de VA (figure 41). Ce résultat montre que le facteur limitant dans le transfert des électrons de la SDH au cyt c dans la souche Gal-YAH1/Fdx2 est le coenzyme Q₆, dont le niveau est rétabli par addition du VA au milieu de culture (données non présentées).

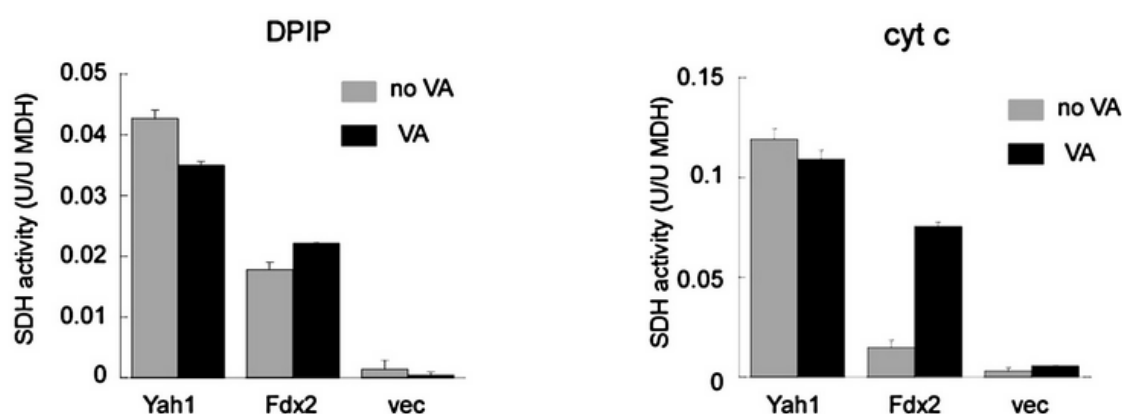


Figure 41: Rétablissement de l'activité SDH-cyt c-réductase dans la souche Gal-YAH1 en présence de VA. La souche Gal-YAH1 transformée avec un vecteur vide (vec), un vecteur contenant YAH1 (Yah1) ou un vecteur contenant FDX2 (Fdx2) a été cultivée en YNB-P 2% glucose pour 26 heures puis en présence ou en absence de 1 mM VA pendant 14 heures. Les mitochondries ont été isolées et les activités enzymatiques de la SDH (succinate-dichlorophénolindophénol [DPIP]) et SDH-complexe III ([cyt c]) ont été déterminées. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n = 3).

Ainsi, nos résultats confirment que la surexpression de Fdx2 complémente le défaut de biosynthèse des centres [Fe – S] dans la souche déplétée en Yah1. En revanche, la surexpression de Fdx2 ne complémente pas le défaut respiratoire de la souche Gal-YAH1 car cette souche n'est pas capable de synthétiser du coenzyme Q₆. Ainsi, Fdx2 est capable de se substituer à la fonction de Yah1 dans la biosynthèse des centres [Fe – S] mais pas dans celle du coenzyme Q₆.

VI. Purification de Coq6

Il nous paraissait intéressant d'étudier la protéine Coq6 *in vitro* afin d'établir un test d'activité *in vitro* pour prouver l'activité hydroxylase de Coq6 et afin de mieux comprendre la relation existante entre Coq6 et la ferrédoxine Yah1 au niveau de l'hydroxylation en C5. Pour cela, nous avons entrepris de surexprimer et puis de purifier Coq6.

VI.1. Clonage et surexpression

Le gène codant pour la protéine Coq6 de *S. cerevisiae* a été recodé afin d'obtenir une meilleure expression dans *E. coli*. Il a ensuite été cloné sous le contrôle du promoteur tac de l'ARN polymérase du bactériophage M13 dans le vecteur de surexpression pMALc2. Un plasmide contenant le gène COQ6 inséré en aval du gène malE, qui code pour la protéine Maltose Binding Protein (MBP), a été ainsi obtenu, contrôlé par séquençage et nommé pMALc2-COQ6. Outre la facilité de purification par chromatographie d'affinité, la fusion de Coq6 à la MBP avait également pour but d'augmenter la solubilité de Coq6 dans *E. coli*. En effet, l'usage d'une fusion à la MBP a été décrit pour augmenter la solubilité des protéines recombinantes (Kapust & Waugh, 1999).

Le plasmide pMALc2-COQ6 a donc été utilisé pour transformer la souche *E. coli* BL21 et parmi les transformants sélectionnés sur un milieu LB-Agar contenant de l'ampicilline, quelques colonies ont été utilisées pour inoculer 100 mL de milieu LB. La culture d'un volume final de 5 L a été effectuée comme décrit dans la partie B.VII.1 dans Matériels et Méthodes. Il faut mentionner que de nombreuses mises au point ont été effectuées par une technicienne au laboratoire afin d'exprimer la protéine Coq6 en partie sous forme soluble. Ce résultat a pu être obtenu en utilisant une concentration de 400 μ M de l'inducteur 'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside' (IPTG) et en cultivant les bactéries à 15°C pendant toute la nuit après induction de la surexpression.

VI.2. Purification de Coq6

La lyse cellulaire et les deux étapes chromatographiques comportant une colonne d'affinité Amylose et une filtration sur gel ont été réalisées comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes B.VII. Les extraits protéiques solubles sont chargés sur une colonne d'affinité Amylose. La séparation et l'élution des protéines s'effectuent grâce à un gradient de maltose de 0 à 20 mM dans un tampon 20 mM du Tris-HCl, pH 7.5, 200mM NaCl et 1 mM EDTA. Après l'analyse par gel SDS-PAGE des différents pics d'élution, une bande majoritaire de 100 kDa, correspondant à Coq6-MBP, est observée dans les fractions éluées à 10 mM de maltose. Un autre pic élué après le pic majoritaire de Coq6-MBP a été détecté dans les fractions éluant entre 15 et 20 mM de maltose (données non présentées). D'après la taille de cette protéine sur gel SDS-PAGE, ce pic correspond certainement à la protéine MBP qui résulte probablement d'un clivage de la fusion suite à une dégradation de Coq6 par les protéases de l'hôte (figure 42).

Les fractions contenant Coq6-MBP ont été rassemblées et purifiées sur une colonne de tamisage moléculaire (Superdex 200). Lors de cette filtration sur gel, Coq6 est éluée sous forme d'un pic principal (données non présentées). Ces deux étapes chromatographiques nous ont permis d'obtenir 40 mg de Coq6-MBP de bonne pureté.

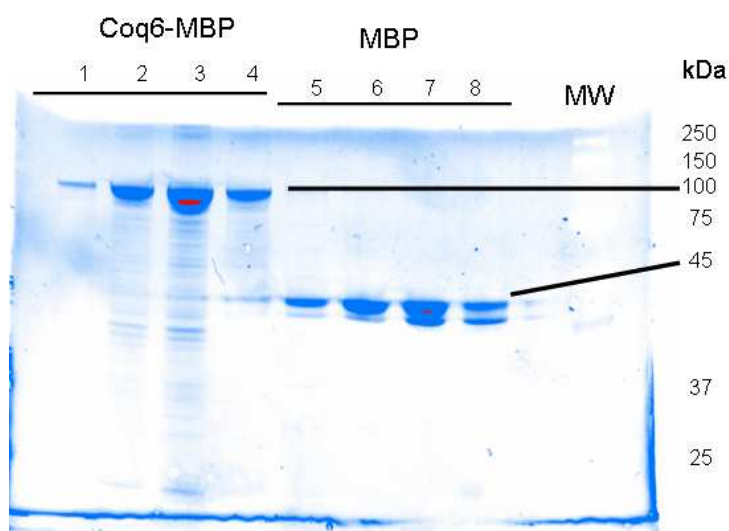


Figure 42: Gel d'électrophorèse SDS-PAGE 12% de la solution de Coq6-MBP purifiée. MW: Marqueur de masse moléculaire; Pistes 1-4: Coq6-MBP éluée à 10 mM maltose; Pistes 5-8: MBP éluée entre 15 et 20 mM maltose.

VI.3. Caractérisation spectroscopique de la protéine Coq6

Afin de vérifier si Coq6 contient, ou peut fixer, une flavine oxydée (FAD), nous avons réalisé une caractérisation spectroscopique de cette protéine incubée ou non avec du FAD. En fait, une incubation de l'enzyme en présence de 10 excès molaires de FAD a été réalisée afin d'éliminer l'hypothèse d'une perte de la flavine au cours de la purification de Coq6; après une heure à température ambiante, l'excès de FAD est éliminé par passage du mélange sur une colonne Nap10.

Les spectres UV-visible du FAD, de Coq6-MBP pure issue de la filtration sur gel et de Coq6-MBP purifiée sur une colonne Nap10 après incubation en présence de 10 excès molaires de FAD sont présentés en figure 43.

Sur les spectres de Coq6, on observe uniquement un pic à 280 nm qui correspond à l'absorbance des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique. L'absence de bandes d'absorption entre 350 et 500 nm, caractéristiques de la flavine oxydée, montre que la protéine Coq6-MBP ne contient pas une flavine oxydée (figure 43).

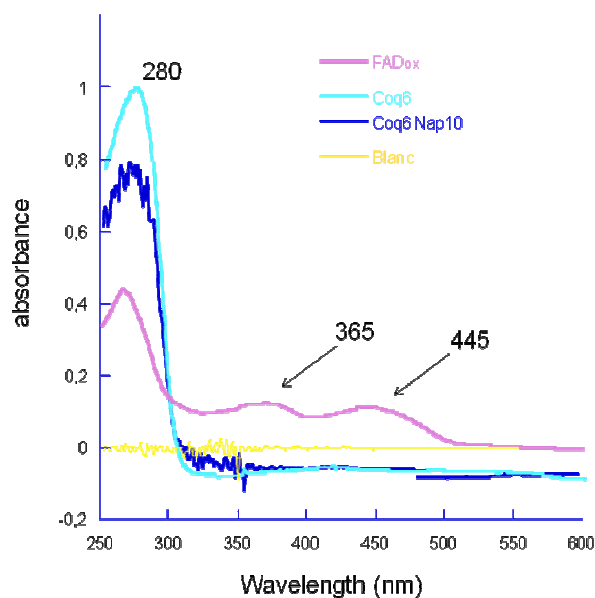


Figure 43: Spectre d'absorption UV-visible du FAD (FAD_{ox}) et de la protéine Coq6 purifiée après une filtration sur gel (Coq6) ou après une filtration sur Nap10 après incubation avec 10 excès molaires de FAD (Coq6Nap10).

Discussion

Une ambiguïté entourait le rôle exact de la protéine Coq6, une mono-oxygénase à flavine proposée comme étant impliquée dans les réactions d'hydroxylation en C1 et/ou C5. Nous avons pu résoudre cette ambiguïté en montrant que Coq6 catalyse uniquement l'hydroxylation en C5 dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆.

Il a été montré que la surexpression de Coq8 entraîne l'accumulation de la DMQ₆ dans un mutant $\Delta coq7$ (Padilla et al, 2009). En surexprimant Coq8 dans le mutant $\Delta coq6$, nous avons montré une accumulation de 4-AP et 4-HP en présence du pABA et de 4-HB respectivement. En outre, l'expression de protéines Coq6 mutées dans des résidus conservés dans $\Delta coq6$ entraîne l'accumulation de ses mêmes intermédiaires. Dans les mutants $coq6$, l'accumulation de 4-AP et 4-HP, qui possèdent tous deux un hydroxyle en C1 mais pas en C5 reflète le défaut d'hydroxylation en C5. Ainsi, la mono-oxygénase à flavine Coq6 est donc impliquée uniquement dans l'hydroxylation en C5 dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆. Par conséquent, l'hydroxylase C1 reste encore inconnue.

Comme Coq6 et Coq7 sont les deux seules protéines Coq présentant une homologie de séquence avec les oxygénases et étant donné que Coq7 catalyse uniquement l'hydroxylation en C6 (Behan & Lippard, 2010; Padilla et al, 2004) et que Coq6 est uniquement impliquée dans l'hydroxylation en C5, nous pensons que l'hydroxylase C1 n'est pas une des protéines Coq (Coq1-Coq10) identifiée jusqu'à présent. En plus, nos résultats montrent que la perturbation du contenu mitochondrial en FAD dans le mutant $\Delta flx1$, affecte l'hydroxylation en C5 mais pas l'hydroxylation en C1. Ce résultat suggère donc que la protéine inconnue qui catalyse l'hydroxylation en C1 n'emploie pas de cofacteur flavinique.

Nos résultats montrent aussi que le VA et le 3,4-diHB peuvent être utilisés comme précurseurs du coenzyme Q₆ et permettent donc de rétablir la biosynthèse du coenzyme Q₆ ainsi que la respiration dans les mutants $coq6$. Il est intéressant de signaler que c'est la première fois que l'emploi d'analogues synthétiques de 4-HB permet de rétablir *in vivo* la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans les mutants déficients pour l'hydroxylation en C5. Ainsi, ces analogues, ajoutés dans le milieu de culture, peuvent atteindre la mitochondrie et entrer dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ après leur prénylation par Coq2.

Cependant, nous avons pu établir que les précurseurs naturels (4-HB et pABA) empêchent facilement ces analogues de 4-HB (VA, 3,4-diHB) de participer à la biosynthèse du coenzyme Q₆. En effet, de faibles concentrations de 4-HB ou du pABA (5 µM) inhibent la synthèse du coenzyme Q₆ rétablie à partir d'1 mM VA et favorisent l'accumulation de 4-HP ou de 4-AP dans les mutants $\Delta coq6/Coq8$. Nous proposons deux explications possibles: soit le transport vers la mitochondrie de VA et 3,4-diHB est moins efficace que celui du pABA ou 4-HB, soit l'affinité de la polyprényltransférase Coq2 pour VA et 3,4-diHB est beaucoup plus faible que celle pour le pABA ou pour le 4-HB.

Des mutations ont été identifiées dans six gènes humains impliqués dans la biosynthèse du coenzyme Q₁₀ dont COQ6 (Heeringa et al, 2011). Nous avons montré que l'ajout de VA et du 3,4-diHB complémente le défaut respiratoire dans les mutants *coq6* de *S. cerevisiae*. Ces deux composés peuvent donc représenter des molécules thérapeutiques intéressantes pour des patients présentant des mutations dans COQ6.

Récemment, Fabien a montré l'implication de la ferrédoxine Yah1 dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ (Pierrel et al, 2010). Nous avons cherché à comprendre la relation entre cette ferrédoxine impliquée dans la biosynthèse des centres [Fe - S] (Lill, 2009) et la mono-oxygénase à flavine Coq6. Nous avons testé en premier temps la stabilité de Coq6 dans les souches déplétées en Yah1 et nous avons montré que Coq6 est présente même quand Yah1 n'est plus détectable par western-blot indiquant ainsi que la déplétion de Yah1 n'affecte pas la stabilité de Coq6 mais uniquement son activité hydroxylase. Le fait que la Fdx2 humaine est capable de compléter le défaut de biosynthèse des centres [Fe - S] (Sheftel et al, 2010), nos résultats) mais pas le défaut d'hydroxylation en C5 dans la biosynthèse de Q₆ dans les cellules déplétées en Yah1 prouve que le défaut de biosynthèse du coenzyme Q₆ dans la souche Gal-Yah1 n'est pas directement lié au défaut de biosynthèse des centres [Fe - S].

Nous avons ensuite testé si l'inactivation de Yah1 pourrait indirectement entraîner une carence mitochondriale en NAD(P)H ou FAD ce qui provoquerait une diminution de l'activité Coq6. Le contenu en FAD mitochondrial n'est pas fortement déplété dans la souche Gal-YAH1 exprimant Fdx2 car cette souche montre une activité significative SDH-cytochrome c-oxydoréductase qui est dépendante de la présence de FAD dans la SDH. En outre, les contenus mitochondriaux en NADPH ne peuvent pas être fortement affectés dans Gal-YAH1 exprimant

Fdx2 parce que cette souche est capable d'assembler les centres [Fe – S], un processus qui est dépendant du NADPH mitochondrial (Pain et al, 2010). A l'appui de cela, nous avons aussi montré que les souches déplétées en Yah1 sont prototrophes pour l'arginine (données non présentées), un acide aminé dont la biosynthèse est dépendante du NADPH mitochondrial produit par Pos5 via la phosphorylation du NADH mitochondrial (Outten & Culotta, 2003).

Comme conclusion, Si Coq6 était une mono-oxygénase à flavine classique catalysant la réduction du FAD en FADH₂ par le NAD(P)H, elle devrait être active dans la souche déplétée en Yah1 or, Coq6 n'est pas active et les niveaux mitochondriaux du FAD et du NAD(P)H ne sont pas affectés.

Par conséquent, nous émettons l'hypothèse d'un mécanisme inhabituel dans lequel la réduction de la flavine de Coq6 pourrait dépendre du système Yah1/Arh1. Habituellement, la réduction directe du FAD nécessite un transfert d'hydrure du NAD(P)H (van Berkel et al, 2006). Dans la littérature, le seul exemple d'une oxygénase à flavine ayant besoin d'une ferrédoxine pour son activité est celui de la zéaxanthine époxidase (Bouvier et al, 1996) mais le rôle exact de la ferrédoxine pour l'activité de cette enzyme n'a pas été élucidé.

La seule façon de tester notre hypothèse est donc de mettre au point un test d'activité *in vitro* de la protéine Coq6 purifiée avec lequel il sera aisé de déterminer si l'activité de Coq6 dépend de la présence du système Fdx/FdxR constitué par Yah1/Arh1. La première étape de ce travail a été validée puisque nous avons pu obtenir la protéine MBP-Coq6 purifiée. Cependant, le spectre d'absorption UV-visible de MBP-Coq6 pure indique qu'elle ne contient pas un cofacteur FAD. Même en présence de 10 excès molaires de FAD, Coq6 ne fixe pas de FAD. La séquence primaire de Coq6 laisse peu de doute quant à son appartenance à la famille des mono-oxygénases à flavine. Ainsi, pour expliquer l'absence de FAD dans Coq6, nous envisageons deux hypothèses : 1) la présence du domaine MBP fusionné à Coq6 pourrait perturber le repliement tridimensionnel de Coq6 et donc gêner la fixation de FAD. Il sera donc important de cliver le domaine MBP et d'évaluer de nouveau la capacité de Coq6 à fixer ou non le FAD. 2) Coq6 pourrait présenter une affinité faible pour le FAD et une affinité plus forte pour une flavine réduite (FADH₂). En effet, il existe des mono-oxygénases à flavine qui fixe FADH₂ puis effectue l'hydroxylation du substrat ce qui conduit à la formation de FAD. Ce FAD est ensuite libéré et une nouvelle molécule de FADH₂ se fixe afin de permettre un nouveau cycle catalytique. Afin de

déterminer si Coq6 fonctionne de cette manière, il faudra tester la fixation de FADH₂ par Coq6 lors d'expériences de reconstitution.

En résumé, cette étude nous a permis de:

- Résoudre l'ambiguïté sur le rôle exact de Coq6 en montrant donc que Coq6 catalyse uniquement la réaction d'hydroxylation en C5 de la voie de biosynthèse de Q suggérant ainsi qu'une nouvelle hydroxylase, non encore caractérisée, est impliquée dans la réaction d'hydroxylation en C1 (figure I).
- Proposer un mécanisme inhabituel dans lequel la mono-oxygénase Coq6 sera dépendante d'une ferrédoxine Yah1 pour son activité.
- Montrer pour la première fois, qu'on arrive à court-circuiter une déficience de la voie de biosynthèse de Q₆ par l'utilisation d'analogues de précurseurs (figure I) suggérant ainsi une nouvelle stratégie pour éclaircir et caractériser les étapes de biosynthèse de Q.

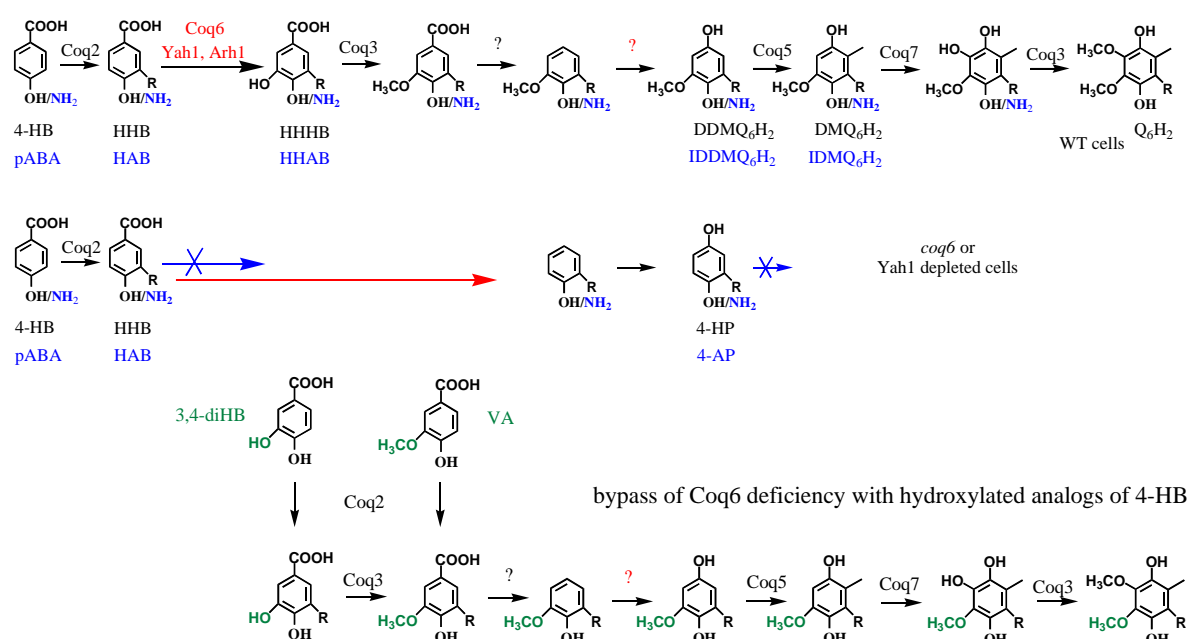


Figure I : Schéma de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ montrant les étapes déficientes dans les mutants *coq6* et la souche Gal-YAH1 et les analogues de 4-HB utilisés pour compléter cette déficience. 4-HP: acide 3-hexaprényl-4-hydroxyphénol; 4-AP: acide 3-hexaprényl-4-

aminophénol; HAB: acide 3-hexaprényl-4-aminobenzoïque; HHB: acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque; DHHB: acide 3-hexaprényl-4,5-dihydroxybenzoïque; HHAB: acide 3-hexaprényl-4-amino-5-hydroxybenzoïque; DDMQ₆H₂: diméthyl-diméthoxyubiquinol; IDDMQ₆H₂: iminodiméthyl-diméthoxyubiquinol; DMQ₆H₂: diméthoxyubiquinol; IDMQ₆: iminodiméthoxyubiquinol; Q₆H₂: ubiquinol; R: chaîne polysoprényle.

Etude de la fonction de Coq8

I. Surexpression de Coq8 dans les différents mutants Δcoq

Sur la base de notre observation que la surexpression de Coq8 entraîne l'accumulation de produits dérivés de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ dans le mutant $\Delta coq6$ et des données qui montrent l'accumulation de la DMQ₆ dans le mutant $\Delta coq7/Coq8$ (Padilla et al, 2009), nous nous sommes posés la question de l'impact d'une surexpression de Coq8 dans les autres mutants Δcoq .

I.1. Accumulation de la DMQ₆ dans $\Delta coq7/Coq8$

Afin de confirmer l'accumulation de la DMQ₆ dans le mutant $\Delta coq7$ surexprimant Coq8 (Padilla et al, 2009), nous avons évalué dans cette souche l'accumulation d'intermédiaires en présence du pABA ou du 4-HB comme précurseur. La surexpression de Coq8 dans le mutant $\Delta coq7$ entraîne l'accumulation du même composé en présence du pABA ou du 4-HB (figure 44). Aucun produit électroactif n'est accumulé dans le mutant $\Delta coq7$ sans surexpression de Coq8 (figure 44). L'identité de ce composé électroactif a été établie précédemment par Padilla en 2009 et confirmée dans nos expériences par son temps de rétention en HPLC et son spectre UV-visible et correspond à la DMQ₆ (figure 45).

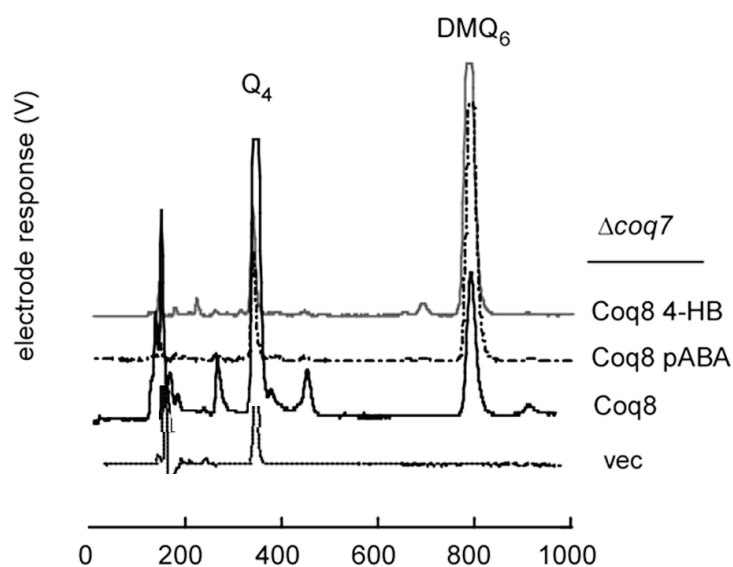


Figure 44: Le mutant $\Delta coq7/Coq8$ accumule la DMQ_6 . Le mutant $\Delta coq7$ transformé avec un vecteur vide (vec) ou avec un vecteur codant pour Coq8 a été cultivé en YNB-P 2% glucose contenant ou non 100 μM 4-HB ou 100 μM pABA. Les extraits lipidiques de 2 mg de cellules ($\Delta coq7/Coq8$), ou 8 mg de cellules ($\Delta coq7/vec$) ont été analysés par HPLC-ECD.

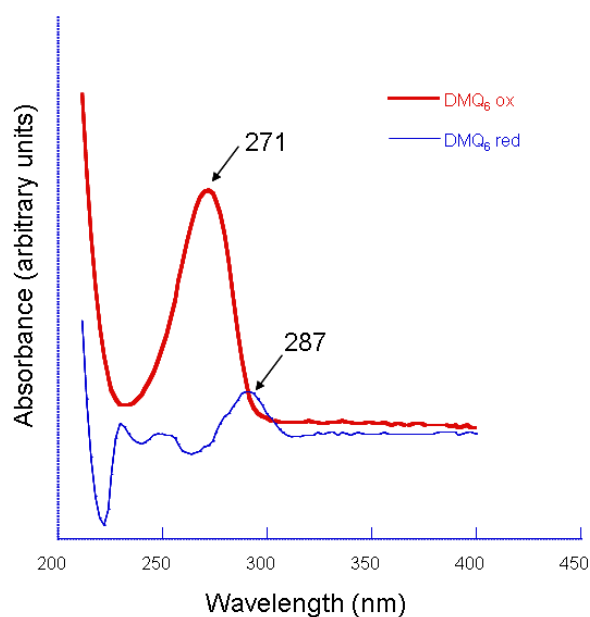


Figure 45: Spectre UV-visible de la DMQ_6 purifiée sous les formes oxydées et réduites. Les produits purifiés ont été injectés sur la colonne de HPLC avec un potentiel de l'électrode de la précolonne fixée à +550 mV (ox) et -550 mV (red).

La synthèse de la DMQ₆ exclusivement et l'absence de synthèse d'imino-déméthylubiquinone (IDMQ₆) dans le mutant $\Delta coq7/Coq8$ en présence du pABA confirme les résultats d'accumulation exclusive de la DMQ₆ dans le mutant ponctuel *coq7-1* (Marbois et al, 2010) aussi que dans une souche exprimant une protéine Coq7 inactive (Pierrel et al, 2010). Ainsi, l'accumulation de la DMQ₆ dans $\Delta coq7/Coq8$ même en présence du pABA indique que la réaction de déamination/hydroxylation en C4 (pour simplifier, dénommée dès maintenant déamination en C4) se produit probablement avant la réaction catalysée par Coq7.

1.2. Accumulation de la DDMQ₆ dans $\Delta coq5/Coq8$

Un nouveau composé électroactif qui élué avant la DMQ₆ est accumulé par le mutant $\Delta coq5/Coq8$ (figure 46). Le composé purifié sous forme oxydée a une masse moléculaire ionique ($M+H^+$) avec un ratio m/z de 547.4150 déterminée par spectrométrie de masse à haute résolution (HR-MS). Cette valeur est compatible avec une formule chimique C₃₇H₅₅O₃ ($M = C_{37}H_{55}O_3$: 547.4151; masse observée: 547.4150; ppm, -0.2) (données non présentées). Ces résultats nous ont permis d'identifier ce composé accumulé comme étant la déméthyl-déméthoxyubiquinone (DDMQ₆), (la forme oxydée du composé numéro 5 sur la figure 10), le substrat de Coq5. Le spectre UV-visible de la DDMQ₆ présente les caractéristiques des produits de biosynthèse du coenzyme Q₆ (figure 47): l'absorbance du produit sous sa forme oxydée est plus intense que celle sous sa forme réduite et cette dernière a son maximum d'absorption à une longueur d'onde (λ) plus importante.

Comme dans le cas de $\Delta coq7/Coq8$, pABA ou 4-HB entraîne la formation du même intermédiaire, la DDMQ₆, dans $\Delta coq5/Coq8$ montrant ainsi que la réaction de déamination en C4 se fait efficacement dans ce mutant.

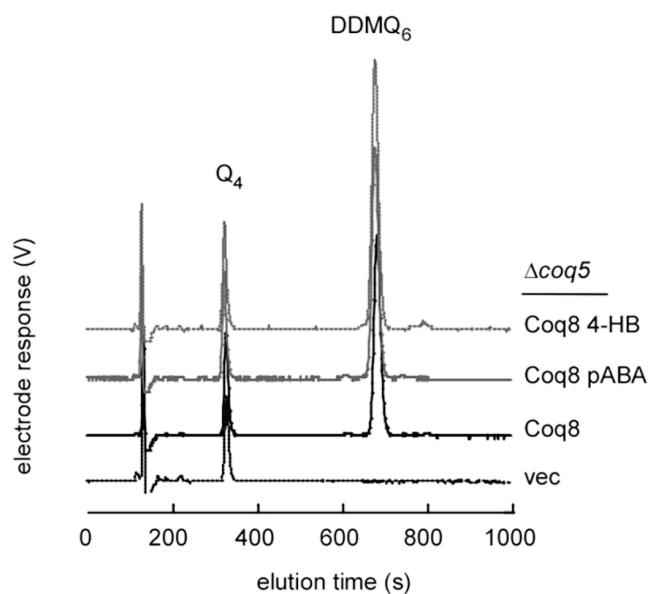


Figure 46: Le mutant $\Delta coq5/Coq8$ accumule la DDMQ₆. Les cellules $\Delta coq5$ transformées avec un vecteur vide (vec) ou avec un vecteur codant pour Coq8 ont été cultivées en YNB-P 2% glucose contenant ou non 100 μ M 4-HB ou 100 μ M pABA. Les extraits lipidiques de 10 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

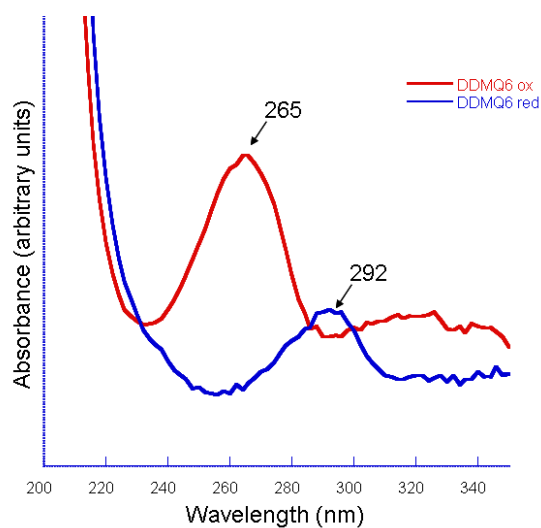


Figure 47: Spectre UV-visible de la DDMQ₆ purifiée sous les formes oxydées et réduites. La DDMQ₆ purifiée a été injectée sur la colonne de HPLC avec un potentiel de l'électrode de précolonne fixée à +550 mV (ox) et -550 mV (red).

Nos collaborateurs américains ont utilisé la technique de marquage avec le carbone 13 des six atomes de carbone du pABA ($^{13}\text{C}_6\text{-pABA}$) ou de 4-HB ($^{13}\text{C}_6\text{-4HB}$) pour confirmer nos résultats. En effet, ils ont détecté la DDMQ₆ marquée ($^{13}\text{C}_6\text{-DDMQ}_6$) uniquement (pas d'imino-déméthyl-déméthoxyubiquinone marquée ($^{13}\text{C}_6\text{-IDDMQ}_6$)) dans le mutant $\Delta\text{coq5}/\text{Coq8}$ cultivé soit en présence du $^{13}\text{C}_6\text{-pABA}$ ou de $^{13}\text{C}_6\text{-4HB}$ (figure 48).

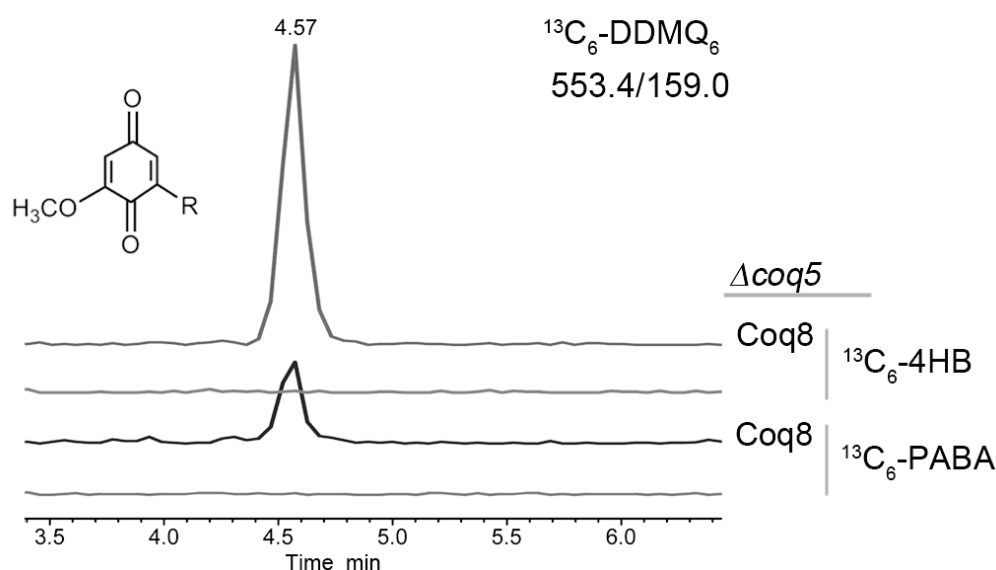


Figure 48: Accumulation de la $^{13}\text{C}_6\text{-DDMQ}_6$ dans le mutant $\Delta\text{coq5}/\text{Coq8}$ en présence du $^{13}\text{C}_6\text{-pABA}$ ou $^{13}\text{C}_6\text{-4HB}$. La souche Δcoq5 transformée avec un vecteur codant pour Coq8 a été cultivée en YP 2% Gal, 0,1% glucose pendant une nuit puis cultivée pendant 2 heures dans 3 mL de l'YNB-P 2% Gal, 0,1% glucose, en présence du $^{13}\text{C}_6\text{-pABA}$ ou $^{13}\text{C}_6\text{-4HB}$ (20 pg /mL). Des extraits lipidiques des cellules ont été analysés par HPLC-MS/MS et la détection des ions de transition a été réalisée en Multiple reaction monitoring (MRM) pour la transition 553.4 à 159.

I.3. Coq9 est essentielle pour les étapes d'hydroxylation en C5 et C6 de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆

Coq9 est une protéine essentielle pour la biosynthèse du coenzyme Q₆ mais dont le rôle est inconnu (Johnson et al, 2005). Après la surexpression de Coq8 dans le mutant Δcoq9 , nous avons détecté l'accumulation de composés électroactifs différents selon que 4-HB ou pABA est utilisé comme précurseur (figure 49). Aucun produit n'a été accumulé dans le mutant Δcoq9 sans

surexpression de Coq8 (figure 49). En présence de 4-HB, deux composés ont été détectés avec des spectres UV-visible et des temps de rétention caractéristiques de la DMQ₆ et de 4-HP (figure 49).

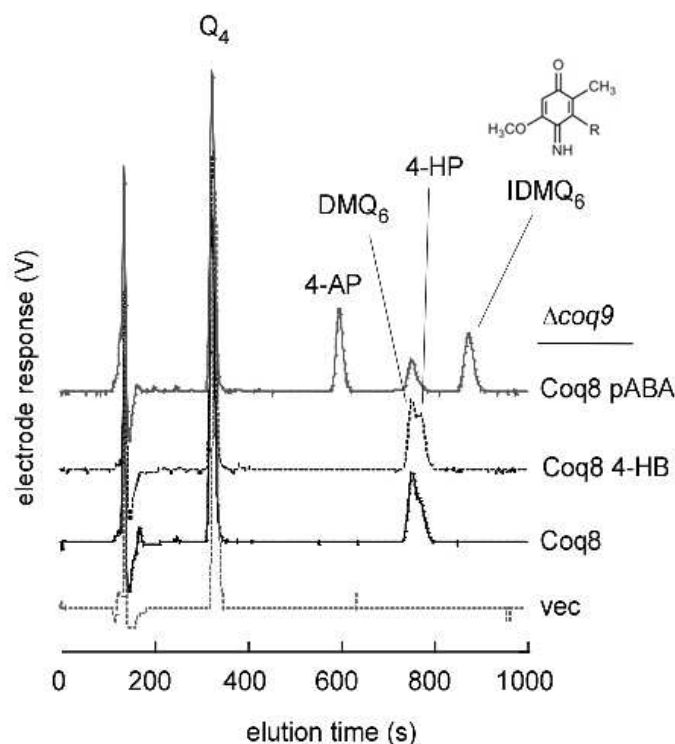


Figure 49: Accumulation de 4-AP/4-HP et DMQ₆/IDMQ₆ dans le mutant $\Delta coq9$ /Coq8. La souche $\Delta coq9$ transformée avec un vecteur vide (vec) ou avec un vecteur codant pour Coq8 a été cultivée en YNB-P 2% glucose contenant ou non 100 μ M 4-HB ou 100 μ M pABA. Les extraits lipidiques de 10 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD. La structure chimique de l'IDMQ₆ est présentée.

En présence du pABA, le composé éluant à 600 s correspond au 4-AP (figure 49) sur la base de son temps de rétention en HPLC et de son spectre UV-visible. En outre, nous avons identifié, par des analyses en spectrométrie de masse, le composé éluant à 860 s comme étant de l'imino-déméthoxyubiquinone (IDMQ₆) (figure 49) ($M = C_{38}H_{58}O_2N$: 560.616; masse observée: 560.641; ppm: -2.1756 (données non présentées)). Il faut également noter la présence de la DMQ₆ même en présence du pABA (figure 49). Cependant, même en cultivant $\Delta coq9$ /Coq8 en présence de 1 mM pABA (données non présentées), ce mutant accumule la DMQ₆.

D'autres expériences de marquage du 4-HB et du pABA avec le C13 (¹³C₆-4HB, ¹³C₆-pABA) faites par nos collaborateurs ont aussi permis de confirmer après une analyse HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS) l'identité des composés accumulés.

Cependant, contrairement à nos observations, $\Delta coq9/Coq8$ n'accumule pas de $^{13}C_6$ -DMQ₆ mais uniquement du $^{13}C_6$ -IDMQ₆ en présence du $^{13}C_6$ -pABA. Comme nos collaborateurs ont utilisés des temps d'incubation des cellules en présence de $^{13}C_6$ -4HB ou $^{13}C_6$ -pABA beaucoup plus courts (2 heures) que ceux que nous avons utilisé pour les incubations avec 4-HB ou pABA (14 heures en moyenne), nous proposons de diminuer le temps de nos cultures pour éviter une métabolisation possible du pABA.

Nos expériences montrent clairement que le mutant $\Delta coq9/Coq8$ accumule non seulement 4-AP/4-HP qui sont les intermédiaires accumulés lors d'un défaut d'hydroxylation en C5 catalysée par Coq6 mais aussi DMQ₆/IDMQ₆ qui dénotent un défaut d'hydroxylation en C6. Ainsi, Coq9 semble importante pour les deux réactions d'hydroxylation en C5 et C6 de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆.

I.4. Accumulation d'intermédiaires précoces de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ dans les mutants $\Delta coq3/Coq8$ et $\Delta coq4/Coq8$

Comme la surexpression de Coq8 dans les mutants $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$ entraîne l'accumulation des substrats de ces deux protéines et étant donné que Coq3 catalyse d'abord la réaction de méthylation en O5 puis celle en O6 (Clarke et al, 1991), nous attendions donc l'accumulation de l'acide 3-hexaprényl-4,5-dihydroxybenzoïque (DHHB), le produit de Coq6 (composé numéro 2 sur la figure 10) dans le mutant $\Delta coq3/Coq8$.

D'une manière surprenante, la surexpression de Coq8 dans le mutant $\Delta coq3$ n'entraîne pas l'accumulation de composés électroactifs de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ (figure 50). Ceci peut être expliqué par une déficience d'hydroxylation en C5 en absence de Coq3. Nous suggérons que le mutant $\Delta coq3/Coq8$, comme le mutant $\Delta coq3$, accumule HHB et HAB en présence de 4-HB et pABA respectivement. HHB et HAB sont des intermédiaires précoces de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ et résultent de la prénylation par Coq2 de 4-HB et du pABA respectivement.

En fait, la Prof. Catherine Clarke et ses collaborateurs ont montré l'accumulation du HHB dans tous les mutants Δcoq , cependant, nos conditions d'extraction ne nous permettent pas de détecter ses intermédiaires accumulés.

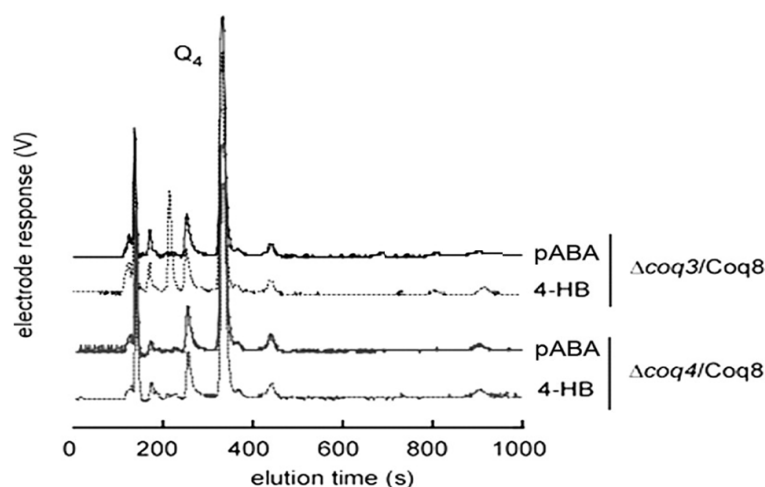


Figure 50: Absence d'accumulation de composés électroactifs dans les mutants $\Delta coq3/Coq8$ et $\Delta coq4/Coq8$. Les cellules $\Delta coq3$ et $\Delta coq4$ transformées avec un vecteur codant pour Coq8 ont été cultivées en YNB-P 2% glucose contenant 100 μ M 4-HB ou 100 μ M pABA. Les extraits lipidiques de 10 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

De même, la surexpression de Coq8 dans $\Delta coq4$ n'entraîne pas l'accumulation de composés électroactifs de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ (figure 50) mais plutôt l'accumulation de HHB et de HAB. Cependant, nos collaborateurs américains ont montré qu'en présence du $^{13}\text{C}_6$ -pABA, la souche portant une mutation ponctuelle dans COQ4 (*coq4-1*) et le mutant $\Delta coq4/Coq8$ accumulent un produit dont la masse correspond à la forme marquée de l'acide 3-hexaprényl-4-amino-5-hydroxybenzoïque ($^{13}\text{C}_6$ -HHAB) (figure 51).

Le HHAB n'a pas été détecté dans la souche WT cultivée en présence du $^{13}\text{C}_6$ -pABA montrant ainsi qu'il n'est pas un intermédiaire accumulé au cours de la biosynthèse du coenzyme Q₆. En fait, il semble que la détection des composés en HPLC-MS/MS chez nos collaborateurs américains est plus sensible que la notre réalisée par HPLC-ECD ou par spectroscopie UV-visible.

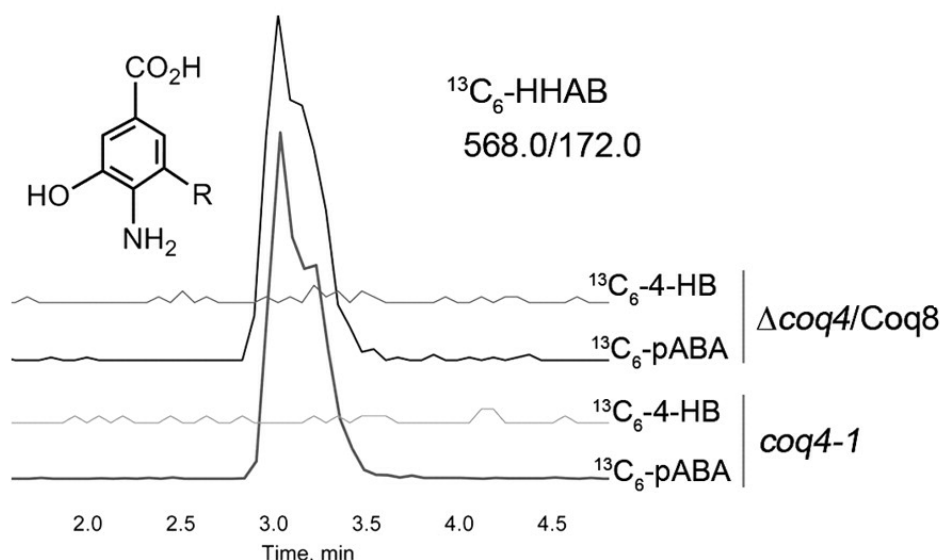


Figure 51: Accumulation de $^{13}\text{C}_6$ -HHAB dans le mutant $\Delta\text{coq4}/\text{Coq8}$ en présence du $^{13}\text{C}_6$ -pABA. La souche Δcoq4 transformée avec un vecteur codant pour Coq8 ou la souche coq4-1 a été cultivée en YP 2% Gal, 0,1% glucose pendant une nuit puis cultivée pendant 2 heures dans 3 mL de l'YNB-P 2% Gal, 0,1% glucose, en présence du $^{13}\text{C}_6$ -pABA ou $^{13}\text{C}_6$ -4-HB (20 pg/mL). Les extraits lipidiques de cellules ont été analysés par HPLC-MS/MS et la détection des ions de transition a été réalisée en MRM pour la transition 568 à 172.

De façon surprenante, le mutant $\Delta\text{coq4}/\text{Coq8}$ n'accumule pas de $^{13}\text{C}_6$ -DHHB, l'équivalent hydroxylé du $^{13}\text{C}_6$ -HHAB, en présence de $^{13}\text{C}_6$ -4-HB. Ce résultat pourrait-être expliqué par l'instabilité du catéchol du DHHB qui pourrait ne pas s'accumuler en quantités détectables dans la souche $\Delta\text{coq4}/\text{Coq8}$.

Collectivement, nos résultats montrent l'accumulation d'intermédiaires précoces de la voie de biosynthèse du coenzyme Q_6 lors de la surexpression de Coq8 dans les mutants Δcoq3 et Δcoq4 . L'accumulation de HHAB dans le mutant $\Delta\text{coq4}/\text{Coq8}$ semble provenir d'un défaut de la réaction de méthylation en O5 catalysée par Coq3. Ainsi, Coq4 pourrait être indispensable à l'activité de Coq3.

II. Les intermédiaires accumulés ne rétablissent pas la croissance sur milieu respiratoire

Afin de tester si les intermédiaires accumulés dans les différents mutants Δcoq surexprimant Coq8 peuvent rétablir la respiration, une expérience de dilution en série a été effectuée sur milieu respiratoire (LG) et fermentable (Glu).

Seuls les mutants Δcoq transformés avec les vecteurs contenant les gènes COQ des délétions correspondantes et la souche WT poussent sur YNB-P LG pABA tandis que toutes les souches poussent sur milieu non respiratoire (YNB-P Glu) (figure 52) montrant ainsi l'incapacité des différents intermédiaires accumulés dans les différents mutants à transférer les électrons dans la chaîne respiratoire et donc à compléter la déficience respiratoire des mutants $\Delta coq/Coq8$.

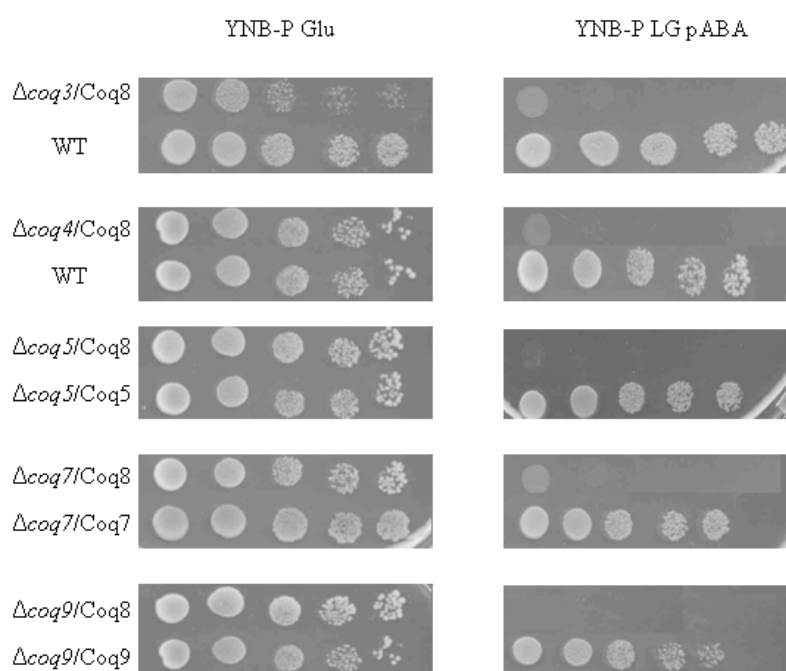


Figure 52: Les mutants $\Delta coq/Coq8$ ne poussent pas sur milieu respiratoire. La souche WT et les mutants Δcoq transformés, soit avec un vecteur contenant COQ8 ou avec des vecteurs contenant les gènes COQ des délétions correspondantes ont été cultivés en YNB-P 2% glucose pendant 24 heures. Après rinçage des cellules avec de l'eau distillée, des dilutions en série ont été déposées sur des boîtes de gélose. Les boîtes contiennent de l'YNB-P-agar supplémenté avec 2% de glucose (YNB-P Glu) ou de 2% de lactate-glycérol contenant 100 μ M pABA (YNB-P LG pABA). Les boîtes ont été incubées pendant 2 jours (Glu) ou 4 jours (LG) à 30°C.

Certains composés (tel DMQ₆) sont proches de coenzyme Q₆ structuellement mais de façon surprenante, ne complémente pas le défaut respiratoire de $\Delta coq7/Coq8$. Comme le potentiel redox de la DMQ₆ est assez proche de celui de coenzyme Q₆, nous expliquons ce résultat par une mauvaise reconnaissance de la DMQ₆ au site actif des complexes de la chaîne respiratoire.

III. La surexpression de Coq8 entraine la stabilité des autres protéines Coq

L'accumulation d'intermédiaires de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ nous a permis d'émettre l'hypothèse que la surexpression de Coq8 entraine la stabilisation des autres protéines Coq du complexe.

Comme nous ne possédons pas d'anticorps pour détecter les protéines Coq, nous avons collaboré avec la Prof. Catherine Clarke aux Etats-Unis pour tester la stabilité des protéines Coq dans les différents mutants Δcoq surexprimant Coq8.

Comme détaillé en introduction et confirmé par les western-blots réalisés sur des extraits cellulaires par nos collaborateurs (figure 53), les protéines Coq4, Coq6, Coq7 et Coq9 sont instables dans les mutants $\Delta coq3-\Delta coq9$. Par contre, la surexpression de Coq8 dans les mutants $\Delta coq3$ et $\Delta coq5$ entraine la stabilité des protéines Coq4, Coq7 et Coq9 (figure 53A-B). De même, la surexpression de Coq8 stabilise les protéines Coq7 et Coq9 dans la souche $\Delta coq4/Coq8$ et les protéines Coq4 et Coq9 dans la souche $\Delta coq7/Coq8$ (figure 53A).

Dans toutes ces expériences, Coq1 a servi comme contrôle de charge du fait que sa stabilité n'est pas affectée dans les mutants Δcoq (Hsieh et al, 2007).

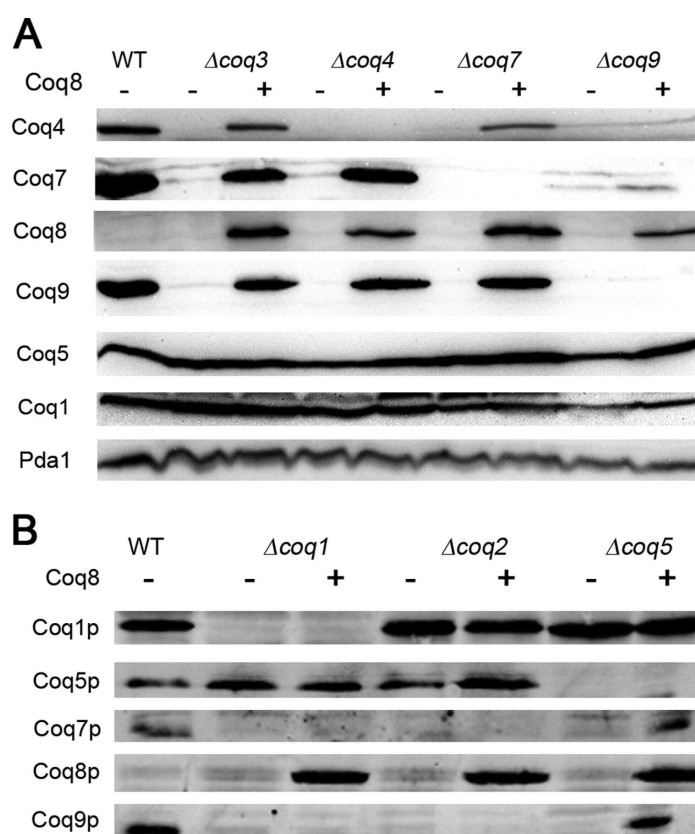


Figure 53: La surexpression de Coq8 entraîne la stabilité des protéines Coq4, Coq7 et Coq9 dans les mutants $\Delta coq3$, $\Delta coq4$, $\Delta coq5$, $\Delta coq7$ et $\Delta coq9$. Les extraits cellulaires ont été préparés à partir d'une souche WT et des mutants Δcoq indiqués surexprimants ou non Coq8. Ces cellules ont été cultivées en YP 2% Gal. Les différentes protéines Coq ont été détectées à leur taille attendue. Les protéines Pda1 (A) ou Coq1 et Coq5 (B) servent comme contrôle de charge.

Par ailleurs, la surexpression de Coq8 n'augmente pas la stabilité des protéines Coq7 et Coq9 dans les mutants $\Delta coq1$ et $\Delta coq2$ malgré le fait que le niveau de la protéine Coq8 est comparable à celui obtenu dans le mutant $\Delta coq5$ (figure 53B). Cependant, Gin et coll. en 2005, ont proposé un rôle stabilisateur des protéines Coq4 et Coq6 par le HHB dont la biosynthèse dépend de Coq1 et Coq2 (Gin et al, 2005). Ainsi, l'inefficacité de la surexpression de Coq8 dans $\Delta coq1$ et $\Delta coq2$ résulte probablement de l'absence d'accumulation d'intermédiaires prénylés de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆. Il est important de signaler que la surexpression de Coq8 ne rétablit pas la stabilité des protéines Coq4 et Coq7 dans le mutant $\Delta coq9$ (figure 53A).

Pour plus de précision et comme les protéines Coq sont mitochondriales, nos collaborateurs ont vérifié la stabilité de certaines protéines Coq dans les mitochondries isolées. Conformément aux résultats des western-blots effectués sur les extraits cellulaires, les protéines Coq4, Coq7 et Coq9 sont détectées dans les mitochondries isolées des mutants $\Delta coq5/Coq8$ et $\Delta coq6/Coq8$ (figure 54A). Des résultats récents ont permis de montrer la stabilité de Coq3 dans les mitochondries isolées des mutants Δcoq en présence d'inhibiteurs de protéases (Tauche et al, 2008; Xie et al, 2011). En effet, nos résultats de la détection de Coq3 même sans surexpression de Coq8 montrent que Coq3 est stable dans les mitochondries isolées des mutants $\Delta coq5$ et $\Delta coq6$ (figure 54A).

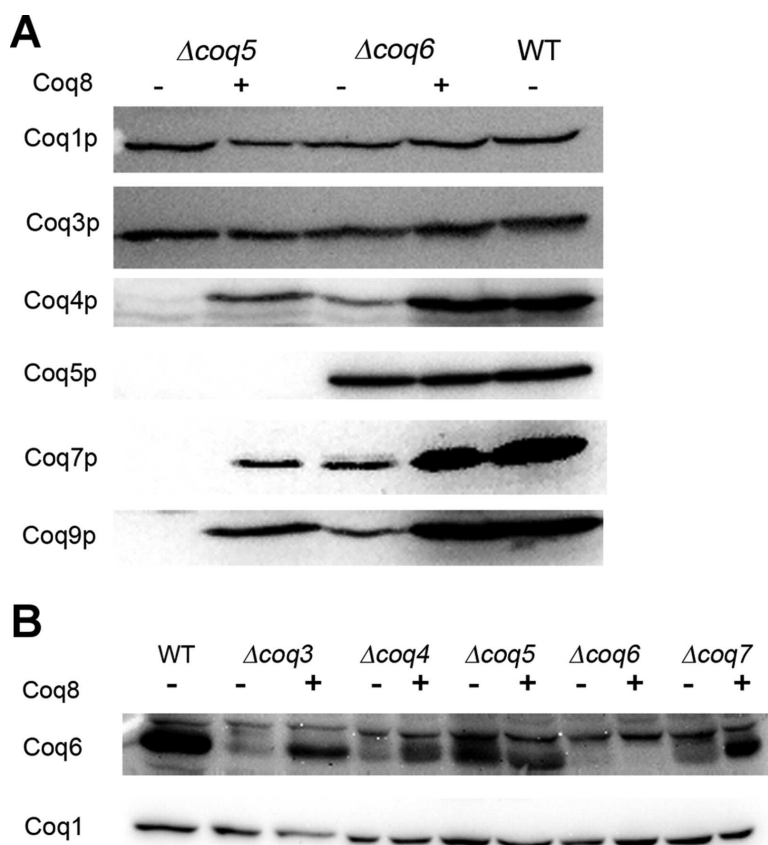


Figure 54: La surexpression de Coq8 rétablit la stabilité des protéines Coq dans des mitochondries isolées. Les mitochondries ont été isolées de la souche WT et des différents mutants Δcoq surexprimant ou non Coq8 suivant le protocole Opti-prep. 20 μ g des protéines ont été analysées sur gel et détectées par les anticorps anti-Coq indiqués (A) ou anti-Coq6 (B). La protéine Coq1 sert comme contrôle de charge.

Comme l'anticorps anti-Coq6 interagit non spécifiquement avec de nombreuses autres protéines de *S. cerevisiae*, la stabilité de la protéine Coq6 a été révélée par un western-blot sur les mitochondries isolées. Comme le montre la figure 54B, le niveau de la protéine Coq6 est rétabli, mais pas au niveau WT, après la surexpression de Coq8 dans les mutants $\Delta coq3$, $\Delta coq4$, $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$.

IV. L'effet stabilisateur de Coq8 est lié à son activité kinase

Quatre mutations ponctuelles (G130D, G130V, R77W et E409K) dans des résidus conservés du gène CABC1/ADCK3, l'homologue humain de COQ8 de *S. cerevisiae*, ont été identifiées en 2008 par Rötig et ses collaborateurs chez quatre patients souffrant des maladies neuronales (Mollet et al, 2008) (figure 55). Ces mutations ont été introduites aux résidus correspondants dans la protéine Coq8 de *S. cerevisiae* qui est exprimée à partir d'un vecteur épisomal (multi-copie), pFL44 (Mollet et al, 2008). Les vecteurs portant les gènes COQ8 mutés nous ont été donné par la Dr. Rötig.

IV.1 Absence d'accumulation d'intermédiaires dans les mutants Δcoq surexprimant des formes inactives de Coq8

Le mutant de *S. cerevisiae* W222 porte une mutation dans le gène COQ8 (Tzagoloff & Dieckmann, 1990) qui entraîne la production d'une protéine Coq8-G130D imitant la mutation pathogène humaine G272D dans ADCK3/CABC1 (Mollet et al, 2008). W222 ne synthétise pas de coenzyme Q₆ et présente des faibles niveaux protéiques de Coq4, Coq7 et Coq9. Par ailleurs, aucune forme phosphorylée de Coq3 n'est détectée dans W222 (Xie et al, 2011) alors que dans cette même étude, les auteurs ont démontré que les formes phosphorylées de Coq3 étaient dépendantes de la présence de Coq8 (Xie et al, 2011). Ainsi, il semble que la mutation G130D inhibe l'activité kinase de Coq8.

Afin de tester l'effet de la mutation G130D dans Coq8 sur l'accumulation d'intermédiaires, nous avons surexprimé Coq8-G130D dans les différents mutants Δcoq . La surexpression de cette forme mutée de COQ8 n'entraîne pas l'accumulation d'intermédiaires dans les mutants $\Delta coq5$,

$\Delta coq6$, $\Delta coq7$ et $\Delta coq9$ (figure 56) montrant ainsi que cette mutation inactive la protéine Coq8 ce qui entraîne l'inhibition de son effet stabilisateur que nous avons montré.

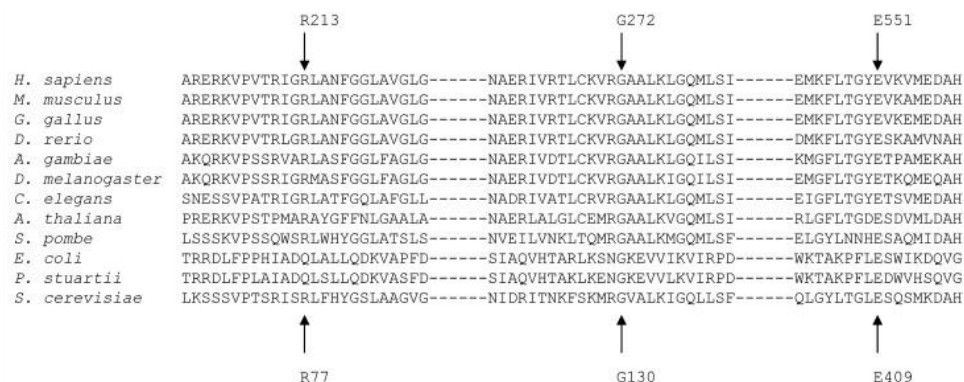
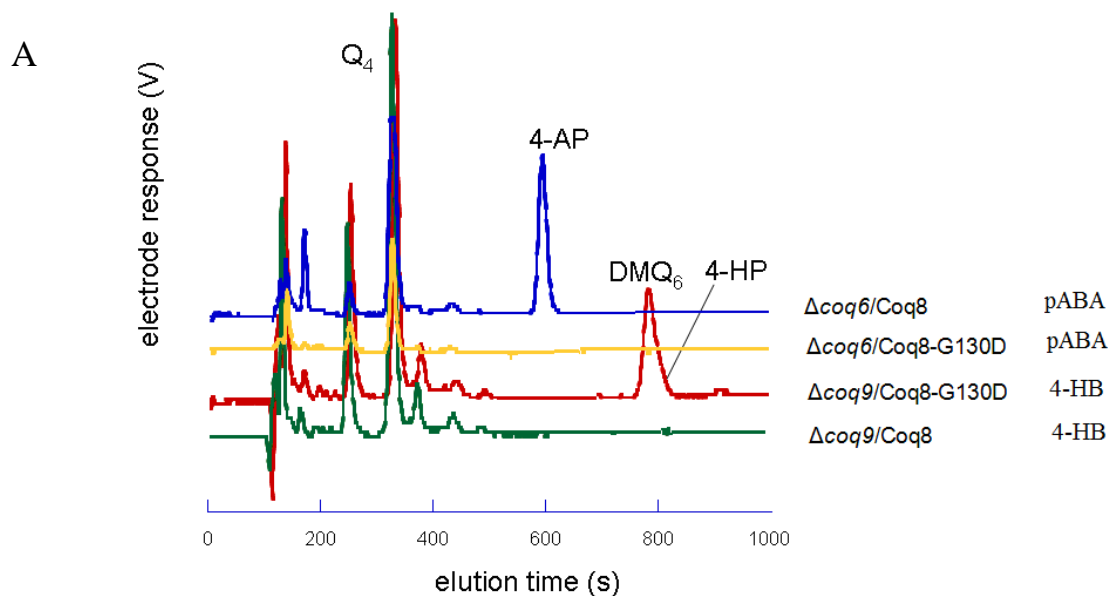


Figure 55: alignement de séquences de la protéine ADCK3/CABC1 humaine et ses homologues non humaines. Les flèches indiquent les diverses mutations trouvées chez les patients (D'après (Mollet et al, 2008)).



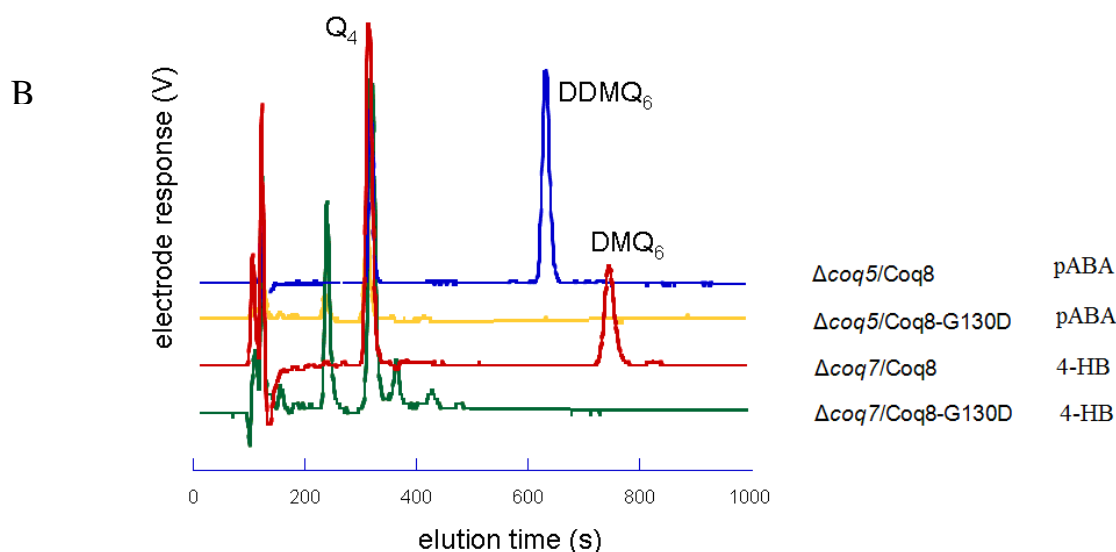


Figure 56: Absence d'accumulation d'intermédiaires dans les mutants $\Delta coq/Coq8\text{-G130D}$. Les mutants $\Delta coq6$, $\Delta coq9$ (A) et $\Delta coq5$, $\Delta coq7$ (B) transformés avec un vecteur codant pour Coq8-G130D ou par un vecteur contenant COQ8 ont été cultivés en YNB-P 2% glucose contenant 100 μM pABA ou 100 μM 4-HB. Les extraits lipidiques de 10 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

Nous étions ensuite intéressés de vérifier la stabilité des protéines Coq dans les mutants $\Delta coq/Coq8\text{-G130D}$. Comme le montre la figure 57, les niveaux protéiques de Coq7 et Coq9 sont rétablis dans la souche $\Delta coq6/Coq8$ mais pas dans $\Delta coq6/Coq8\text{-G130D}$ (figure 57). De même, Coq9 est stable dans le mutant $\Delta coq7/Coq8$ mais pas dans $\Delta coq7/Coq8\text{-G130D}$ (figure 57).

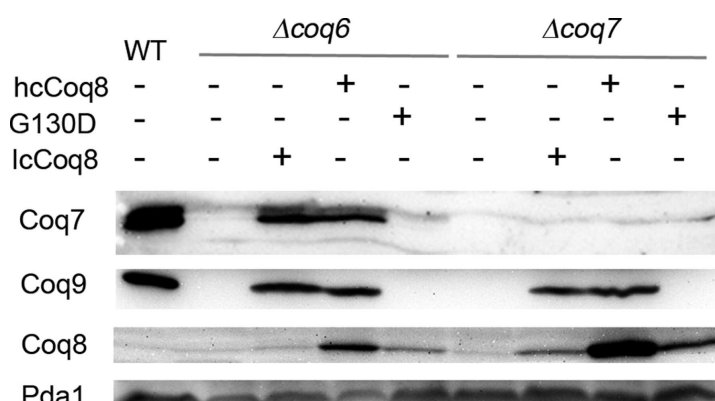


Figure 57: La surexpression de Coq8-G130D ne rétablit pas la stabilité des autres protéines Coq. Les extraits cellulaires ont été préparés à partir des souches WT et des mutants $\Delta coq6$ et $\Delta coq7$ surexprimants COQ8 dans un vecteur multi-copie (hcCoq8), un vecteur centromérique (lcCoq8) ou le vecteur multi-copie

exprimant Coq8-G130D (G130D). Ces cellules ont été cultivées en YP 2% Gal. Les différentes protéines Coq ont été détectées à leurs tailles attendues. Pda1 sert comme contrôle de charge.

Même si COQ8 et Coq8-G130D ont été clonés dans le même vecteur épisomal, le niveau de protéine Coq8 détectable par nos collaborateurs dans les extraits cellulaires est supérieur pour la forme WT par rapport à la forme G130D (figure 57). L'expression de Coq8 à partir du vecteur centromérique (lcCOQ8) confère un niveau de Coq8 inférieur à Coq8-G130D exprimée à partir du vecteur épisomal dans les souches $\Delta coq6$ et $\Delta coq7$, mais cette faible surexpression de Coq8 WT est suffisante pour rétablir les niveaux de Coq7 et Coq9 (figure 57). Ainsi, l'expression de Coq8 même à un niveau plus faible que celle obtenue pour la forme G130D est suffisante à la stabilisation de Coq7 et Coq9 ce qui implique que l'absence de stabilisation par Coq8-G130D provient de l'absence d'activité kinase.

En conclusion, ces résultats montrent l'importance de l'activité kinase de Coq8 pour la stabilité des autres protéines du complexe.

V. Effet de l'ajout d'analogues de 4-HB au milieu de culture des mutants $\Delta coq/Coq8$

Sur la base du rétablissement de la biosynthèse du coenzyme Q_6 dans les mutants *coq6* en ajoutant du 3,4-diHB et de VA (Chapitre I), nous avons voulu tester l'effet d'analogues de 4-HB sur les différents mutants $\Delta coq/Coq8$. Ces analogues ont été choisis afin d'essayer de court-circuiter l'étape(s) déficiente(s) du mutant Δcoq particulier.

V.1. Le mutant $\Delta coq7/Coq8$ synthétise de coenzyme Q_6 à partir du 2,4-diHB

Nos résultats ont confirmé l'accumulation de la DMQ₆ dans les mutants $\Delta coq7/Coq8$ (figure 58) et le mutant ponctuel *coq7-1*. Afin d'essayer de court-circuiter la réaction d'hydroxylation en C6 catalysée par Coq7, nous avons testé l'ajout de l'acide 2,4-dihydroxybenzoïque (2,4-diHB), un composé qui contient un hydroxyle en position C6 (voir tableau 3, Matériels et Méthodes).

L'ajout du 2,4-diHB au milieu de culture permet de rétablir la biosynthèse du coenzyme Q_6 dans la souche $\Delta coq7/Coq8$ (figure 58) mais entraîne également la formation d'un nouveau composé électroactif éluant à 780 s (très proche de la DMQ_6). Néanmoins, ce composé électroactif n'est pas la DMQ_6 parce que sous sa forme oxydée, il montre un maximum d'absorbance en UV-visible à 265 nm différent de celui à 271 nm pour la DMQ_6 (figure 59). L'identité de ce composé n'a pas été établie à cause de la faible quantité produite.

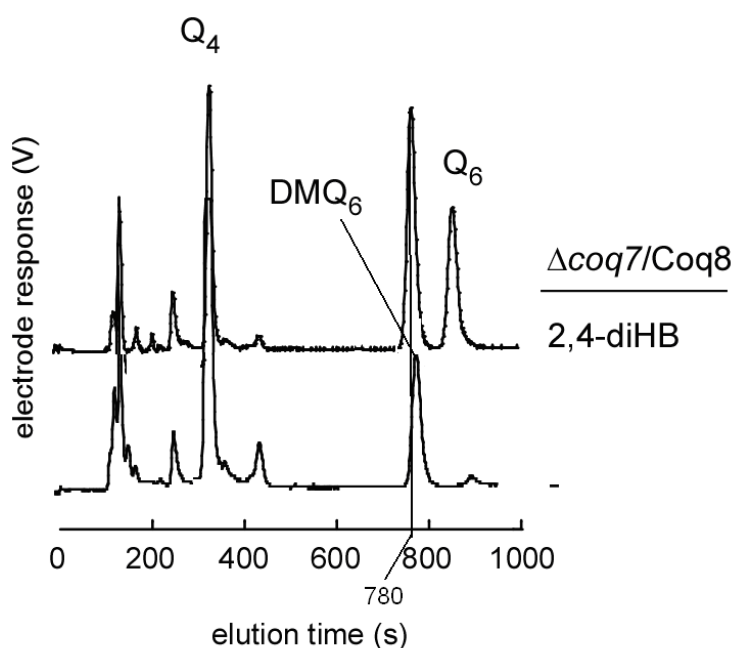


Figure 58: Rétablissement de la biosynthèse du coenzyme Q_6 dans le mutant $\Delta coq7/Coq8$ en présence du 2,4-diHB. Le mutant $\Delta coq7$ transformé avec un vecteur contenant $COQ8$ a été cultivé en YNB-P 2% glucose contenant ou non 1 mM 2,4-diHB. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

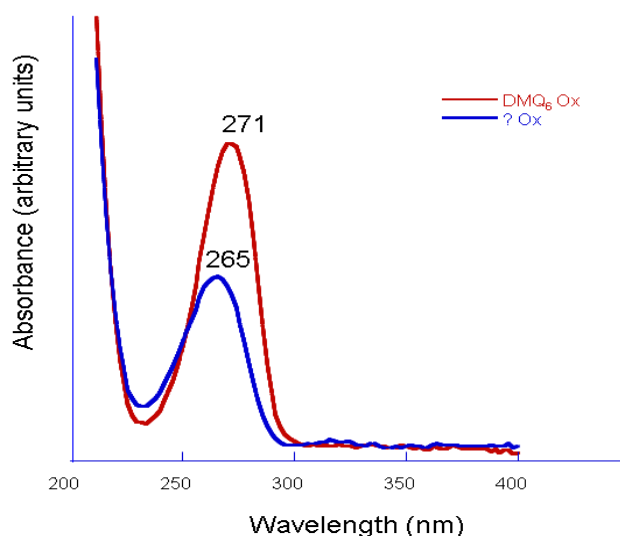


Figure 59: Spectre UV-visible de la DMQ₆ et du nouveau composé accumulé (?) en présence du 2,4-diHB dans $\Delta coq7/Coq8$ sous la forme oxydée. Les produits ont été injectés sur la colonne HPLC avec un potentiel de l'électrode de la précolonne fixé à +550 mV (ox).

V.1.a. Le coenzyme Q₆ synthétisé dans le mutant $\Delta coq7/Coq8$ à partir du 2,4-diHB est fonctionnel

Le mutant $\Delta coq7/Coq8$ accumule la DMQ₆ et par suite n'arrive pas à croître sur milieu respiratoire. Une expérience de dilution en série a été faite sur milieu respiratoire (LG) et sur glucose (Glu) pour tester la fonctionnalité du coenzyme Q₆ synthétisé dans les mutants $\Delta coq7/Coq8$ en présence de 2,4-diHB (figure 60). En fait, toutes les souches poussent sur milieu non respiratoire (Glu) (figure 60). Seul le mutant $\Delta coq7$ transformé avec le vecteur contenant COQ7 pousse sur LG en présence de 4-HB tandis que le mutant $\Delta coq7/Coq8$ pousse uniquement sur LG en présence du 2,4-diHB (figure 60). Ce résultat montre que le coenzyme Q₆ synthétisé à partir du 2,4-diHB dans $\Delta coq7/Coq8$ est fonctionnel. Cependant, le mutant $\Delta coq7/Coq8$ -G130D ne pousse pas sur LG même en présence du 2,4-diHB (figure 60) confirmant ainsi que la surexpression de Coq8-G130D ne stabilise pas les protéines Coq et par suite n'aboutit pas à la biosynthèse du coenzyme Q₆.

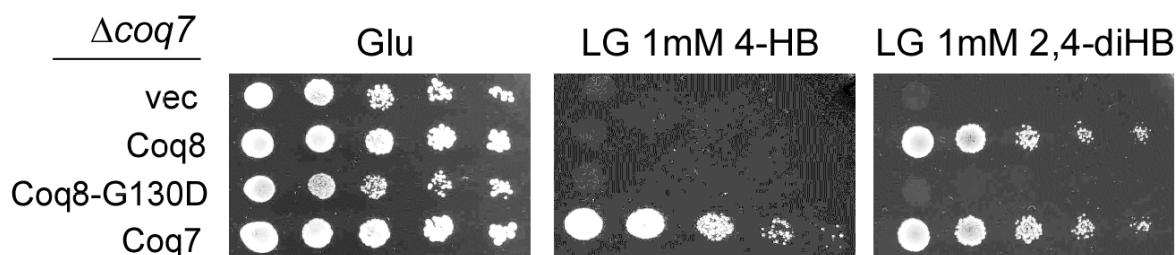


Figure 60: Expérience de dilution en série montrant la fonctionnalité du coenzyme Q_6 synthétisé à partir du 2,4 diHB dans le mutant $\Delta coq7/Coq8$. Le mutant $\Delta coq7$ transformé avec un vecteur vide ou avec des vecteurs épisomaux codant pour Coq8, Coq8-G130D ou Coq7 a été cultivé en YNB-P 2% glucose pendant 24 heures. Après rinçage des cellules avec de l'eau distillée, des dilutions en série ont été déposées sur des boîtes de gélose. Les boîtes contiennent de l'YNB-P agar supplémenté avec 2% de glucose (Glu) ou de 2% de lactate-glycérol (LG) contenant les concentrations indiquées du 2,4-diHB ou de 4-HB. Les boîtes ont été incubées pendant 2 jours (Glu) ou 4 jours (LG) à 30°C.

Collectivement, nos résultats montrent que l'ajout du 2,4-diHB court-circuite la déficience d'hydroxylation en C6 qui conduit au défaut de biosynthèse du coenzyme Q_6 dans les mutants $\Delta coq7$, sous la condition de stabilisation du complexe protéique par Coq8.

V.2. L'ajout de VA entraine l'accumulation de la DMQ_6 dans le mutant $\Delta coq3/Coq8$

Le mutant $\Delta coq3/Coq8$ accumule le HAB et le HHB en présence du pABA et du 4-HB respectivement. Ce résultat était surprenant car, suite à la stabilisation des protéines Coq4, Coq6, Coq7 et Coq9 dans ce mutant (figure 53A, 54B), nous comptons observer l'accumulation de DHHB, le produit de l'hydroxylation C5 catalysée par Coq6. Nous avons donc essayé l'ajout de VA pour court-circuiter à la fois la réaction d'hydroxylation en C5 catalysée par Coq6 et la méthylation en O5 catalysée par Coq3. En effet, l'ajout de VA dans le milieu de culture, entraine l'accumulation de la DMQ_6 dans le mutant $\Delta coq3/Coq8$ (figure 61).

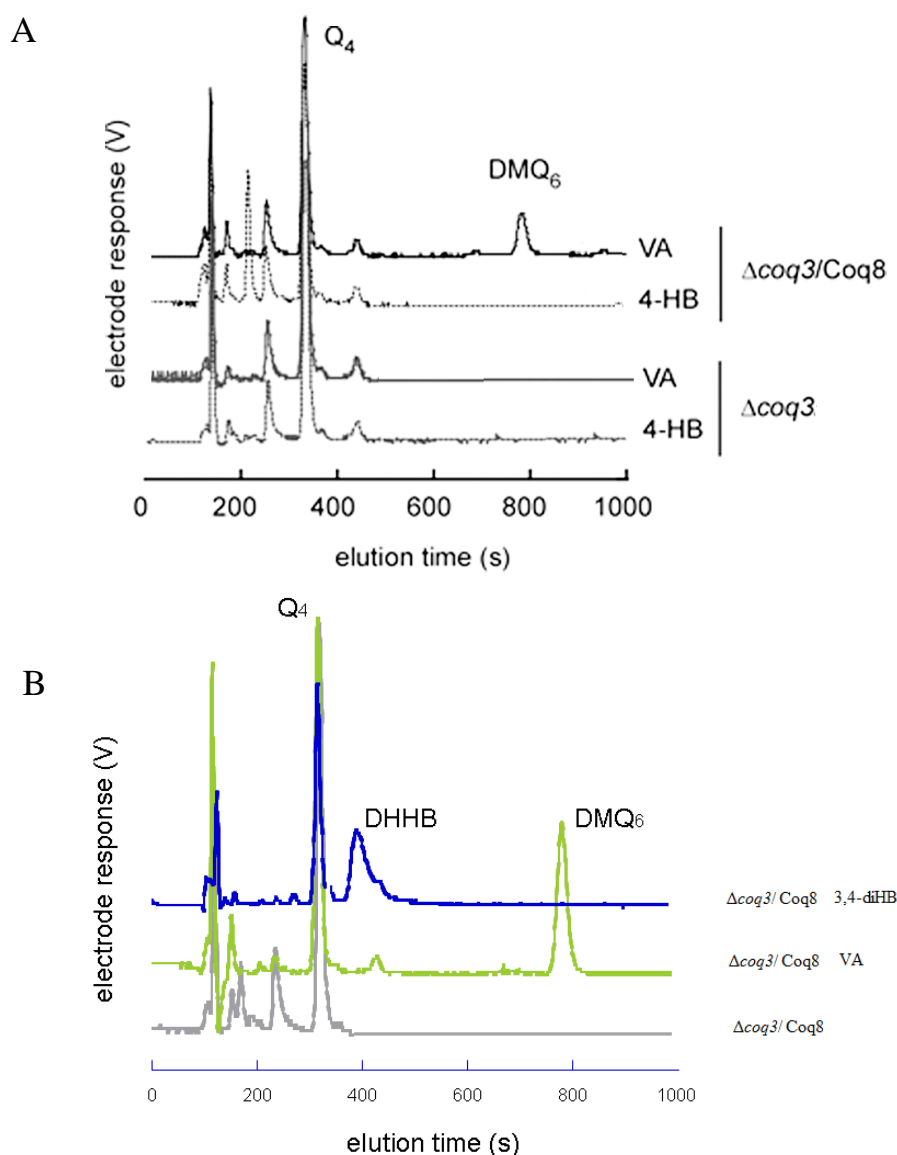


Figure 61: Accumulation de la DMQ_6 en présence de VA et de DHHB en présence du 3,4-diHB dans le mutant $\Delta coq3/Coq8$. A) La souche $\Delta coq3$ transformée ou non avec un vecteur exprimant Coq8 a été cultivée en YNB-P 2% glucose contenant 100 μM 4-HB ou 1 mM VA. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD. B) La souche $\Delta coq3$ transformée avec un vecteur exprimant Coq8 a été cultivée en YNB-P 2% glucose contenant ou non 1 mM VA ou 1 mM 3,4-diHB. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

Ainsi, l'accumulation de la DMQ_6 dans le mutant $\Delta coq3/Coq8$ en présence de VA montre que la décarboxylation en C1, l'hydroxylation en C1 et la méthylation en C2 sont catalysées en absence de Coq3. En revanche, les deux étapes d'hydroxylation en C5 et C6 sont affectées

montrant ainsi l'intérêt de la présence de Coq3 pour ces deux réactions. Il faut aussi mentionner que l'ajout de 1 mM 3,4-diHB entraîne l'accumulation du DHHB dans le mutant $\Delta coq3/Coq8$ (figure 61B). En effet, le 3,4-diHB va être prénylé par Coq2 entraînant ainsi l'accumulation d'une quantité détectable du DHHB.

V.3. Effet de l'ajout d'analogues de 4-HB sur le mutant $\Delta coq4/Coq8$

Le mutant $\Delta coq4/Coq8$ et le mutant ponctuel *coq4-1* accumule du HHAB en présence du pABA (figure 51). Ce résultat montre que, malgré la présence de Coq3, l'activité O5-méthyltransférase est affectée en absence de Coq4. L'ajout du 3,4-diHB dans le milieu de culture de $\Delta coq4/Coq8$ n'entraîne pas l'accumulation de DHHB. De plus, en présence de VA, le mutant $\Delta coq4/Coq8$ n'accumule ni la DMQ₆ ni la forme prénylée de VA, l'acide 3-hexaprényl-4-hydroxy-5-méthoxybenzoïque (figure 62A). Nous traiterons l'effet de l'ajout d'analogues hydroxylés/méthoxylés du pABA sur tous les mutants dans le chapitre III car il nous donne des informations sur la réaction de déamination en C4. Cependant, pour le mutant $\Delta coq4$, nous traitons dans ce chapitre l'effet d'analogues de pABA car ces expériences nous apportent des informations supplémentaires sur le rôle de cette protéine.

En effet, l'ajout de l'acide 3-hydroxy-4-aminobenzoïque (3O,4N-B) entraîne l'accumulation de HHAB (figure 62A). Ceci montre que le 3O,4N-B peut être prénylé par Coq2 et ce résultat est en accord avec la déficience de la méthylation en O5 en absence de Coq4.

En outre, en présence de l'équivalent aminé de VA, l'acide 3-méthoxy-4-aminobenzoïque (AMB), $\Delta coq4/Coq8$ et le mutant ponctuel *coq4-1* accumulent de l'acide 3-hexaprényl-4-amino-5-méthoxybenzoïque (HMAB, un composé non électroactif) (figure 62B).

L'accumulation de HMAB pourrait être interpréter comme résultat d'une déficience pour la décarboxylation en C1. Cependant HMAB est aussi détecté dans la souche WT cultivée en présence de l'AMB (figure 62B); nos données sont donc insuffisantes pour proposer une implication de Coq4 dans la réaction de décarboxylation en C1.

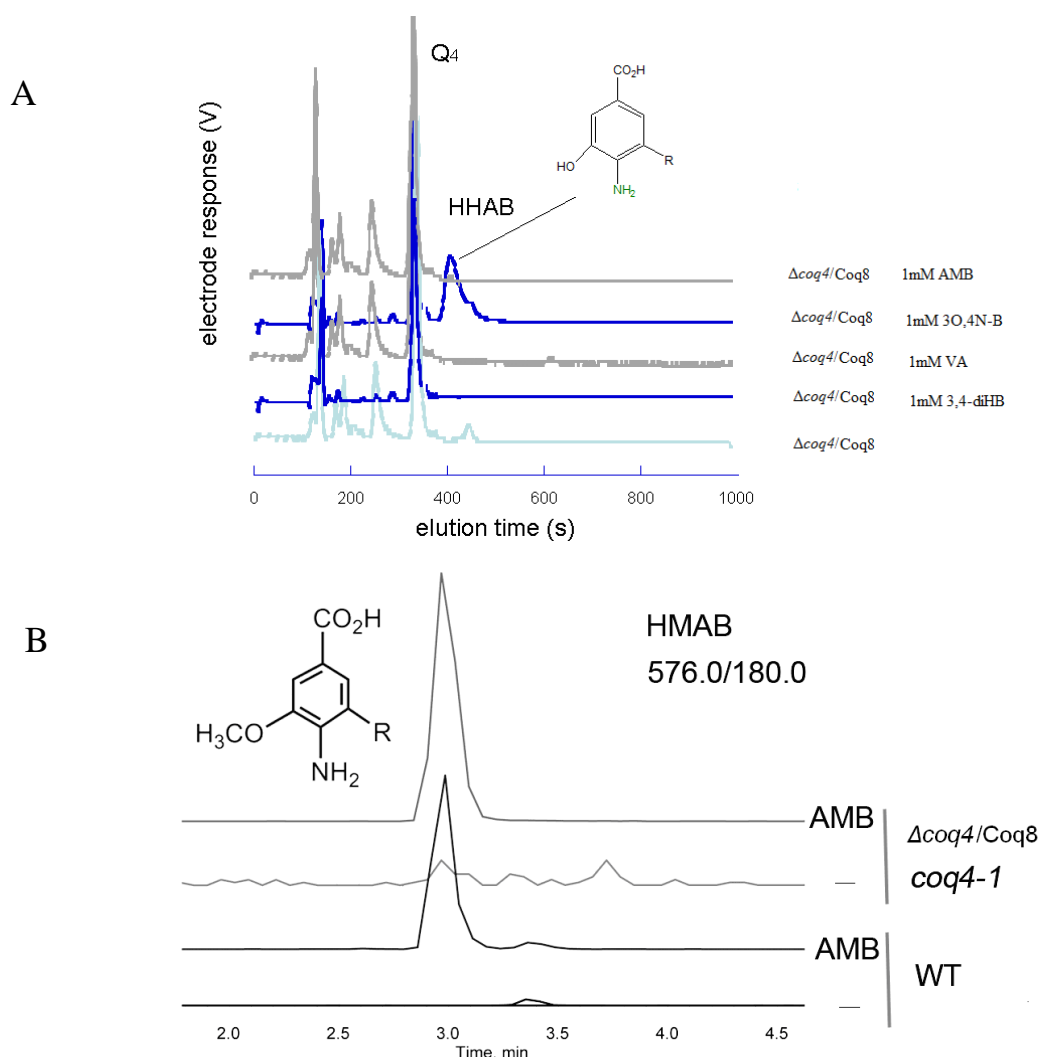


Figure 62: Absence d'accumulation d'intermédiaires hydroxylés dans le mutant $\Delta coq4/Coq8$. A) La souche $\Delta coq4$ transformée avec un vecteur exprimant Coq8 a été cultivée en YNB-P 2% glucose contenant les concentrations indiquées de 3O,4N-B, AMB, 3,4-diHB et VA. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD. B) La souche $\Delta coq4$ transformée avec un vecteur contenant COQ8, la souche portant une mutation ponctuelle dans COQ4 ($coq4-1$) et la souche WT ont été cultivées en YP 2% Gal, 0,1% glucose pendant une nuit puis cultivées pendant 2 heures en YNB-P 2% Gal, 0,1% glucose, en absence (-) ou en présence de 100 μ M de l'AMB. Les extraits lipidiques des cellules ont été analysés par HPLC-MS/MS et la détection des ions de transition a été réalisée avec MRM pour la transition 576 à 180.

Nos résultats montrent donc qu'inversement aux autres mutants Δcoq , la surexpression de Coq8 dans $\Delta coq4$ entraîne uniquement l'accumulation d'intermédiaires précoces de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆. En outre, nos résultats montrent qu'en plus du défaut d'O5-

méthylation, au moins, une autre réaction (décarboxylation en C1) est aussi affectée par l'absence de Coq4. Ceci suggère fortement l'absence d'un rôle catalytique de Coq4 ce qui est en accord avec son rôle structural proposé (Marbois et al, 2009). Pourtant et d'une façon inexplicée, nos résultats montrent une prénylation des analogues aminés mais pas hydroxylés en absence de cette enzyme.

V.4. Déficience complète pour l'hydroxylation en C6 dans le mutant $\Delta coq9/Coq8$

Nous avons montré que l'absence de Coq9 affecte les 2 réactions d'hydroxylation (C5 et C6) de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ car des intermédiaires diagnostiques d'une déficience dans ces étapes 4-AP/4-HP d'une part et DMQ₆/IDMQ₆ d'autre part s'accumulent dans la souche $\Delta coq9/Coq8$ (figure 49). L'addition de 1 mM VA dans le milieu de culture, permet d'augmenter le contenu en DMQ₆ dans $\Delta coq9/Coq8$ (figure 63) indiquant ainsi que la déficience d'hydroxylation en C6 demeure malgré le fait que la déficience d'hydroxylation en C5 est court-circuitée par l'ajout de VA.

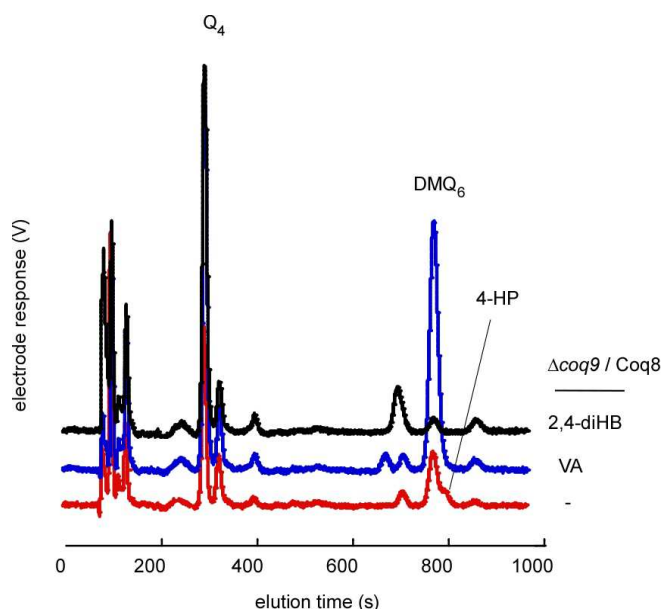


Figure 63: Déficience au niveau de l'hydroxylation C6 dans le mutant $\Delta coq9/Coq8$. La souche $\Delta coq9$ transformée avec un vecteur exprimant Coq8 a été cultivée en YNB-P 2% glucose contenant 100 μ M 4-HB, 1 mM VA ou 1 mM 2,4-diHB. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

Nous avons ensuite testé l'effet d'ajouter le 2,4-diHB, qui rétablit la synthèse de coenzyme Q₆ dans le mutant $\Delta coq7/Coq8$, sur le mutant $\Delta coq9/Coq8$. En ajoutant du 2,4-diHB dans le milieu de culture de $\Delta coq9/Coq8$, nous avons remarqué l'absence de coenzyme Q₆, la diminution du contenu cellulaire en DMQ₆ et l'accumulation d'un nouveau composé éluant à 730 s (figure 63). Cependant, nous pouvons expliquer l'absence de synthèse de coenzyme Q₆ à partir du 2,4-diHB dans le mutant $\Delta coq9/Coq8$ par le faible niveau de rétablissement des protéines Coq (figure 53). En effet, la quantité d'intermédiaires accumulés dans $\Delta coq9/Coq8$ est beaucoup moins importante que celle des mutants $\Delta coq7/Coq8$ et $\Delta coq6/Coq8$, qui possèdent un meilleur rétablissement des niveaux protéiques (figure 53 et figure 54).

Nous avons finalement testé l'ajout de l'acide 2,3,4-trihydroxybenzoïque (2,3,4-triHB), qui devrait en théorie court-circuiter une déficience d'hydroxylation en C5 et C6, sur le mutant $\Delta coq9/Coq8$. Comme le montre la figure 64, l'utilisation de cet analogue de 4-HB entraîne une forte diminution de la quantité de DMQ₆ accumulée dans $\Delta coq9/Coq8$. De plus, ce composé inhibe fortement la synthèse du coenzyme Q₆ et l'accumulation de la DMQ₆ dans une souche WT (figure 64). Ainsi, le 2,3,4-triHB ne peut pas être utilisé pour court-circuiter l'hydroxylation en C5 et C6.

Nos résultats avec le 2,3,4-triHB sont en accord avec un modèle dans lequel ce composé pourrait bloquer la prénylation des précurseurs endogènes du coenzyme Q₆. Ainsi, il n'est pas possible de rétablir la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans $\Delta coq9/Coq8$ qui a des déficiences dans plusieurs étapes de biosynthèse ce qui montre la limite d'utilisation des analogues de 4-HB.

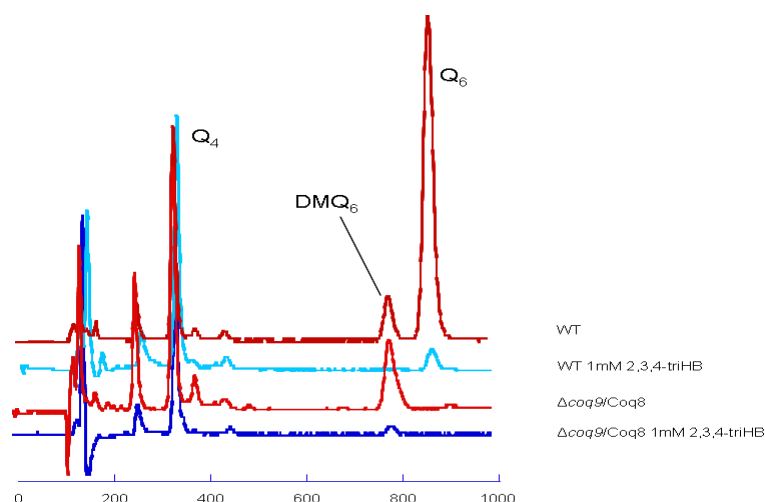


Figure 64: Le 2,3,4-triHB inhibe la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans une souche WT. La souche $\Delta coq9$ transformée avec un vecteur exprimant Coq8 et la souche WT ont été cultivées en YNB-P 2% glucose

contenant ou non 1 mM VA ou 1 mM 2,3,4-triHB. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

Discussion

La plupart des protéines impliquées dans la biosynthèse du coenzyme Q₆ chez *S. cerevisiae* sont associées au sein d'un complexe multiprotéique (Tran & Clarke, 2007). L'organisation des protéines Coq dont la plupart n'ont pas de domaines transmembranaires en un complexe multiprotéique associé à la membrane interne mitochondriale permet de mieux comprendre comment ces protéines peuvent accéder à leurs substrats qui sont des composés lipophiles ancrés dans la membrane interne mitochondriale (Olson & Rudney, 1983). L'absence de n'importe quelle protéine du complexe ($\Delta coq3$ - $\Delta coq9$) entraîne la dégradation des protéines Coq4, Coq6, Coq7 et Coq9. Ceci peut conduire évidemment à une altération dans l'assemblage de ce complexe multiprotéique.

Notre présente étude établit que la surexpression de Coq8 stabilise les protéines Coq4, Coq6, Coq7 et Coq9 dans les mutants $\Delta coq3$ - $\Delta coq7$. Après avoir été décrit pour Coq4 (Zampol et al, 2010), nous montrons donc que la surexpression de Coq8 stabilise également la plupart des protéines Coq. De plus, les protéines stabilisées par la surexpression de Coq8 sont actives car elles permettent l'accumulation d'intermédiaires de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ dans les mutants Δcoq suggérant ainsi que le complexe multiprotéique est au moins partiellement assemblé.

La protéine Coq8 a été proposé comme une protéine kinase qui participe à la phosphorylation *in vivo* des protéines Coq3, Coq5 et Coq7 (Xie et al, 2011; Zampol et al, 2010). La mutation G130D dans COQ8 abolit la phosphorylation de Coq3 suggérant que cette mutation altère l'activité kinase de Coq8 (Xie et al, 2011).

Nous avons montré que la surexpression de Coq8-G130D n'entraîne pas l'accumulation d'intermédiaires dans les mutants Δcoq car les protéines Coq ne sont pas stabilisées. Ainsi, l'activité kinase de Coq8 semble essentielle pour la stabilisation des protéines du complexe, particulièrement pour Coq4, Coq6, Coq7 et Coq9. Pour expliquer la stabilisation du complexe par la surexpression de Coq8, nous proposons que cette surexpression hyper-phosphoryle des protéines Coq particulières qui pourraient moduler l'assemblage et la stabilité du complexe. Un

des candidats potentiels est la protéine Coq3 dont l'association avec le complexe a été montrée comme dépendante de sa phosphorylation par Coq8 (Tauche et al, 2008).

Il pourrait donc être intéressant d'évaluer le taux de phosphorylation de Coq3 dans une souche WT surexprimant ou non Coq8 afin de définir si la surexpression de Coq8 entraîne une hyperphosphorylation de Coq3. Cependant, la surexpression de Coq8 dans le mutant $\Delta coq3$ entraîne la stabilité des autres protéines Coq montrant ainsi que la phosphorylation de Coq3 n'est pas essentielle pour la stabilisation du complexe multiprotéique et que probablement la phosphorylation d'autres protéines Coq est aussi importante.

Xie et al, en 2011 ont été les premiers à étudier la phosphorylation des protéines Coq de *S. cerevisiae* par ADCK3/CABC1, l'homologue humain de Coq8. Ils ont démontré une complémentation partielle du défaut de biosynthèse du coenzyme Q₆ ainsi que le rétablissement de la phosphorylation des protéines Coq3, Coq5 et Coq7 dans le mutant $\Delta coq8$ exprimant ADCK3/CABC1 suggérant ainsi une conservation de la fonction kinase entre Coq8 et ADCK3/CABC1. Ainsi, certaines protéines humaines qui participent à la biosynthèse du coenzyme Q₁₀ pourraient être phosphorylées et l'identification de ces protéines sera importante. Il sera également intéressant de déterminer si cette phosphorylation dépend d'ADCK3/CABC1. Enfin, il sera aussi important d'établir si les protéines humaines de biosynthèse du coenzyme Q₁₀ sont associées dans un complexe multiprotéique et si l'assemblage de ce complexe dépend de l'activité kinase d'ADCK3/CABC1. Cela ne semble pas être le cas chez *E. coli* car les mutants $\Delta ubiF$, $\Delta ubiE$ et $\Delta ubiB$ accumulent de DMQ₈, de DDMQ₈ et de l'octaprénylphénol (OPP) respectivement. Ceci suggère fortement que la stabilité des protéines d'un potentiel complexe protéique impliqué dans la biosynthèse du coenzyme Q₈ ne semble pas dépendante d'une activité kinase d'UbiB.

Par ailleurs, la question qui se pose maintenant est de connaître le rôle physiologique de la phosphorylation des protéines Coq par Coq8. Cette phosphorylation peut être considérée comme un régulateur positif de la biosynthèse du coenzyme Q₆ parce qu'elle semble favoriser l'assemblage du complexe biosynthétique ce qui devrait aboutir à une augmentation de la biosynthèse du coenzyme Q₆. Au contraire, une phosphorylation des résidus Ser²⁰, Ser²⁸ et Thr³² de Coq7 a un impact négatif sur la biosynthèse du coenzyme Q₆ (Martin-Montalvo et al, 2011). En effet, une augmentation des formes phosphorylées de Coq7 entraîne une forte diminution des niveaux de coenzyme Q₆ et l'accumulation de la DMQ₆, le substrat de Coq7. La conclusion des

auteurs était donc que la phosphorylation de Coq7 réduit son activité hydroxylase (Martin-Montalvo et al, 2011). Cependant, il reste à établir l'identité de la kinase impliquée dans la phosphorylation des sites régulateurs de Coq7.

La surexpression de Coq8 nous a permis aussi d'avancer dans la compréhension des rôles joués par les protéines Coq4 et Coq9. Ces deux protéines font partie du complexe multiprotéique de biosynthèse du coenzyme Q₆ (Tran & Clarke, 2007).

L'absence de Coq4 altère au moins deux étapes de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆. En effet, l'accumulation de HHAB dans $\Delta coq4/Coq8$ en présence du pABA reflète le défaut de la réaction de méthylation en O5 catalysée par Coq3. En outre, l'ajout de VA n'entraîne pas l'accumulation de la DMQ₆ dans la souche $\Delta coq4/Coq8$, contrairement à ce que nous avons observé dans la souche $\Delta coq3/Coq8$ (figure 50), révélant qu'au moins une autre étape de biosynthèse en aval de la méthylation en O5 est altérée. Ainsi, il semble que Coq4 n'est pas spécifiquement impliquée dans une étape de biosynthèse du coenzyme Q₆ ce qui suggère un rôle structural plutôt que catalytique pour cette protéine. Cette proposition est en accord avec l'hypothèse que Coq4 pourrait être impliquée dans la liaison de la queue polyisoprényle des intermédiaires de biosynthèse du coenzyme Q₆ et permettre ainsi la modification du noyau aromatique par les protéines douées d'activités catalytiques (Rea et al, 2010). Il est intéressant de noter qu'une levure diploïde portant une délétion d'un allèle de COQ4 montre une diminution du contenu en coenzyme Q₆. Ce résultat montre qu'un niveau WT de la protéine Coq4 est crucial pour la fonction normale du complexe de biosynthèse du coenzyme Q₆ (Salviati et al, 2012). Comme une haplo-insuffisance du gène COQ4 entraîne une carence en coenzyme Q₁₀ chez un patient (Salviati et al, 2012), la protéine humaine Coq4, elle aussi, peut avoir le même rôle structural proposé pour la protéine Coq4 de *S. cerevisiae*.

La surexpression de Coq8 dans $\Delta coq9$ entraîne l'accumulation de deux intermédiaires électroactifs (4-AP/4-HP et IDM₆/DM₆) contrairement aux mutants $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$ qui accumulent le substrat des enzymes inactivées. L'accumulation de 4-AP/4-HP établit la déficience de la réaction d'hydroxylation en C5 catalysée par Coq6. Cependant, l'hydroxylation en C5 se produit dans une certaine mesure car des intermédiaires en aval de cette réaction, DM₆/IDM₆ sont également détectés dans $\Delta coq9/Coq8$. L'accumulation de la DM₆/IDM₆ traduit donc un blocage total au niveau de l'hydroxylation en C6 catalysée par Coq7. En fait,

l'hydroxylation en C6 est complètement bloquée en absence de Coq9 car même en ajoutant de VA, qui court-circuite le défaut d'hydroxylation en C5, $\Delta coq9/Coq8$ accumule plus de la DDMQ₆ mais pas de coenzyme Q₆ ni de démethylQ₆.

Le rôle exact de Coq9 surtout dans les réactions d'hydroxylations en C5 et C6 n'est pas encore clair, mais Coq9 semble être importante pour la stabilité de Coq7 car les niveaux protéiques de Coq7 sont indétectables dans les mutants $\Delta coq9/Coq8$ (figure 53). Néanmoins, Coq9 n'est pas absolument nécessaire pour la stabilité du complexe multiprotéique, parce que l'accumulation de la DDMQ₆ implique que toutes les protéines Coq impliquées en amont de Coq7 sont, au moins partiellement, stables et actives.

Afin de mieux comprendre la relation entre Coq9 et Coq7, nous envisageons de réaliser une mutagenèse aléatoire du mutant $\Delta coq9/Coq8$ pour rétablir la biosynthèse du coenzyme Q₆ et donc la croissance sur milieu respiratoire en présence de 3,4-diHB ou VA. Des mutations dans COQ7 pourraient rendre cette protéine indépendante de Coq9. L'obtention de mutants et l'identification des mutations pourraient nous amener à mieux comprendre le rôle joué par Coq9 et son effet sur Coq7.

Dans le mutant $\Delta coq7/Coq8$, l'ajout du 2,4-diHB au milieu de culture rétablit la biosynthèse du coenzyme Q₆ mais entraîne l'accumulation majoritaire d'un produit dont le spectre UV-visible et le temps de rétention pourrait correspondre à la DDMQ₆-C6 (figure 65). En fait le composé accumulé présente un maximum d'absorption à 265 nm sous sa forme oxydée (figure 59) parfaitement comparable à celui de la DDMQ₆ oxydée (figure 47). En plus, la DDMQ₆-C6 élue entre la DDMQ₆ et la DMQ₆ suggérant ainsi que sa structure n'est pas très éloignée de ces deux composés. Une analyse en masse sera donc nécessaire pour essayer d'identifier la nature de ce composé.

Nous avons aussi montré que l'ajout de 2,4-diHB ne rétablit pas la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans le mutant $\Delta coq9/Coq8$. Ce résultat nous paraissait surprenant dans le sens où nous nous attendions à court-circuiter le défaut d'hydroxylation en C6 et à observer la synthèse d'une faible quantité de coenzyme Q₆ comme dans le cas du mutant $\Delta coq7/Coq8$. Nous n'avons pas d'explication claire pour ce résultat mais nous pouvons proposer que, d'après la faible quantité de coenzyme Q₆ accumulée dans $\Delta coq7/Coq8$, le 2,4-diHB n'est pas très bien prénylé par Coq2 (en comparant avec le VA par exemple). Une autre possibilité est que l'accumulation du composé, supposé être DDMQ₆-C6, bloque la biosynthèse du coenzyme Q₆ ce qui pourrait aussi

expliquer le faible niveau de Q₆ synthétisé dans $\Delta coq7/Coq8$ en présence du 2,4-diHB (figure 58).

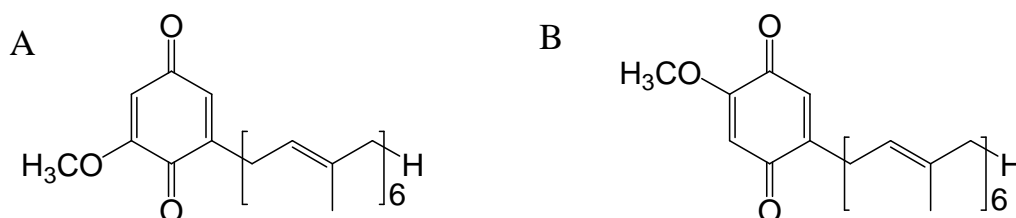


Figure 65: Structure de la DDMQ₆ (A) et de la DDMQ₆-C6 (B).

Ainsi, Coq6 pourrait ne pas bien fonctionner pour hydroxyler en C5 un composé ayant un hydroxyle ou un méthoxyle en C6. Comme en plus l'activité de Coq6 est limitée dans $\Delta coq9/Coq8$, alors l'hydroxylation en C5 des produits de prénylation de 2,4-diHB pourrait être l'étape limitante pour expliquer l'absence de biosynthèse du coenzyme Q₆ en présence de 2,4-diHB. La purification et l'identification du produit élué près de la DMQ₆ va nous aider à mieux comprendre l'effet du 2,4-diHB sur les mutants $\Delta coq7/Coq8$ et $\Delta coq9/Coq8$.

Suite aux intermédiaires accumulés dans les mutants $\Delta coq/Coq8$, notre présente étude nous a permis de classer les mutants Δcoq en deux catégories. La première regroupe les mutants qui déaminent/hydroxylent en C4, $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$. Ces mutants accumulent des composés hydroxylés: la DDMQ₆ et la DMQ₆ à partir du pABA ou de 4-HB. La deuxième catégorie comporte $\Delta coq6$ et $\Delta coq9$ où deux classes d'intermédiaires sont accumulées: 4-AP/IDMQ₆ en présence du pABA (intermédiaires aminés) et 4-HP/DMQ₆ en présence de 4-HB (intermédiaires hydroxylés).

Les résultats et les discussions de la déamination en C4 font l'objet du troisième chapitre de cette thèse. Par ailleurs, dans une culture sans additifs, les mutants qui ne déaminent pas, $\Delta coq6$ et $\Delta coq9$, accumulent principalement des intermédiaires hydroxylés (4-HP et DMQ₆) suggérant ainsi que le précurseur endogène préférentiellement employé pour la biosynthèse du coenzyme Q₆ est le 4-HB et non le pABA.

En résumé, cette étude nous a permis de montrer que:

- La surexpression de Coq8 permet l'accumulation des intermédiaires de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ (figure II) ce qui nous a permis de confirmer les fonctions de certaines protéines Coq (Coq5, Coq7) et de découvrir la fonction de la protéine Coq6.

- L'activité stabilisatrice du complexe protéique est dépendante de l'activité kinase de Coq8.

- L'absence de Coq9 affecte les deux étapes d'hydroxylation en C5 et en C6 (figure II).

Ainsi, la surexpression de Coq8 combiné à l'utilisation d'analogues de précurseurs va certainement nous permettre une meilleure compréhension de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆.

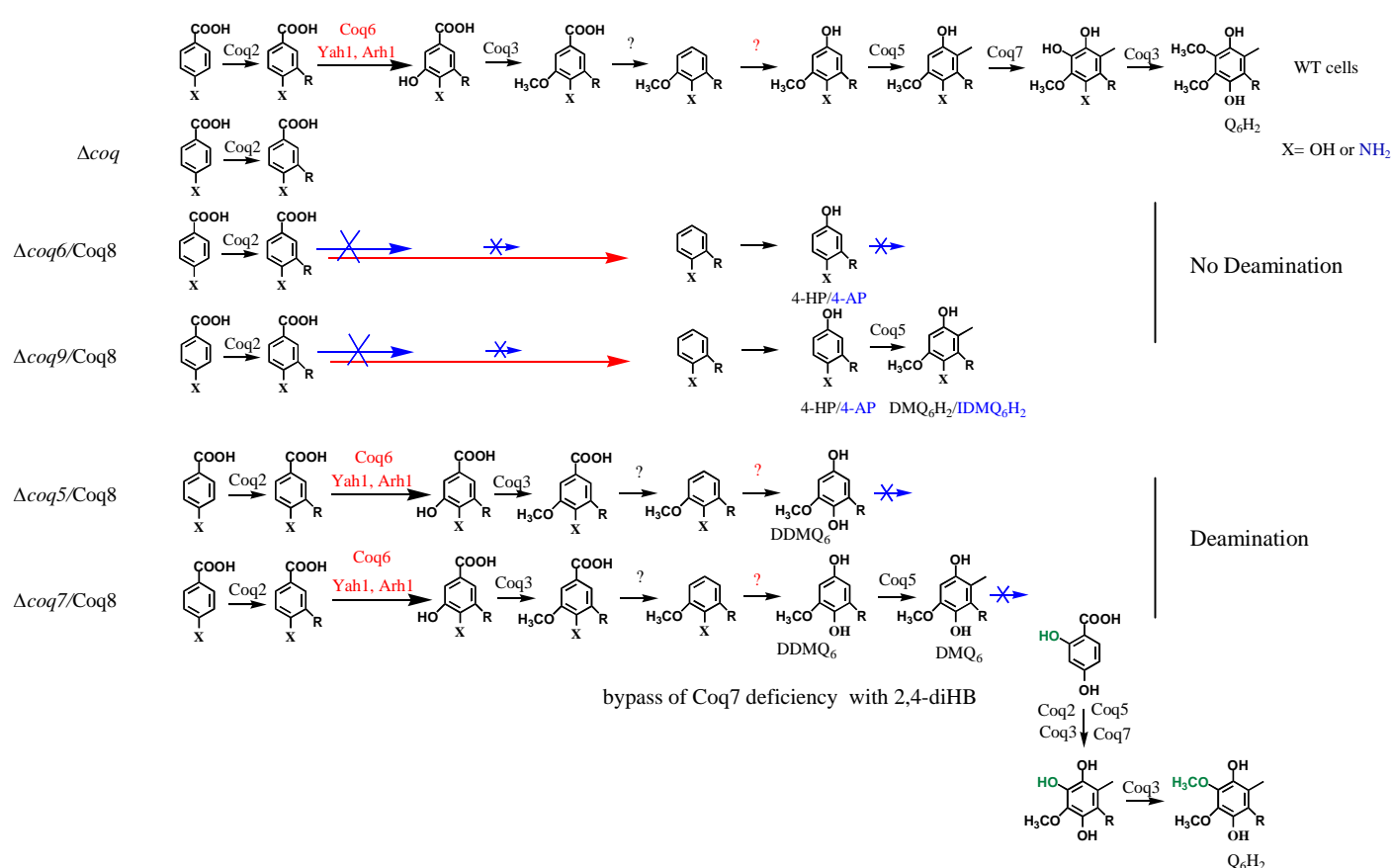


Figure II: Schéma de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ montrant les différents intermédiaires accumulés dans les mutants $\Delta coq/Coq8$. 4-HP: acide 3-hexaprényl-4-hydroxyphénol; 4-AP: acide 3-hexaprényl-4-aminophénol; HAB: acide 3-hexaprényl-4-aminobenzoïque; HHB: acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque; DHHB: acide 3-hexaprényl-4,5-dihydroxybenzoïque; HHAB: acide 3-hexaprényl-4-amino-5-hydroxybenzoïque; DDMQ₆H₂: déméthyl-déméthoxyubiquinol; IDDMQ₆H₂: iminodéméthyl-déméthoxyubiquinol; DMQ₆H₂: déméthoxyubiquinol; IDMQ₆: iminodéméthoxyubiquinol; Q₆H₂: ubiquinol; R: chaîne polysioprényle.

Analogues de substrats et déaminase

Après l'étude sur Coq8, nous avons classé les mutants Δcoq en deux catégories: les mutants qui déaminent, $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$ et ceux qui ne déaminent pas du tout, $\Delta coq6$ ou pas efficacement $\Delta coq9$. Dans le but d'essayer de mieux comprendre l'étape de déamination, nous avons testé l'effet d'analogues de substrats aminés sur les différents mutants Δcoq . Une approche génétique a aussi été mise en place pour essayer d'identifier l'enzyme qui catalyse la réaction de déamination que nous appellerons dans ce chapitre la déaminase.

I. Effet d'analogues de substrats aminés sur les différents mutants Δcoq

I.1. Accumulation de l'IDMQ₆ dans les mutants $\Delta coq6/Coq8$ et $\Delta coq9/Coq8$

Nous avons montré que l'ajout de VA ou du 3,4-diHB dans le milieu de culture court-circuite le défaut d'hydroxylation en C5 des mutants $\Delta coq6$ et $\Delta coq9$. Nous avons donc voulu tester l'effet de l'acide 3-hydroxy-4-aminobenzoïque (3O,4N-B), la version aminée du 3,4-diHB et l'effet de l'acide 3-méthoxy-4-aminobenzoïque (AMB), la version aminée du VA (tableau 3, Matériels et Méthodes) sur ces mutants.

Suite à l'augmentation de la quantité du coenzyme Q₆ synthétisée dans une souche WT après l'ajout du 3O,4N-B ou de l'AMB dans le milieu de culture (figure 66), nous suggérons que ces analogues de pABA peuvent atteindre les mitochondries, peuvent être prénylés par Coq2 puis transformés en Q₆.

En présence du 3O,4N-B ou de l'AMB, le mutant $\Delta coq6/Coq8$ accumule un nouveau composé électroactif éluant juste après le coenzyme Q₆, l'IDMQ₆ (figure 67A). Aucune formation de coenzyme Q₆ ou d'autres intermédiaires n'a été détecté. L'identité de l'IDMQ₆ a été établie précédemment (Voir Chapitre II) et confirmée dans ces expériences par son temps de rétention en HPLC et son spectre UV-visible (données non présentées).

D'une façon non reproductible, le HHAB a été détecté dans $\Delta coq6/Coq8$ cultivé en présence du 3O,4N-B mais pas en présence de l'AMB (données non présentées).

En présence de l'AMB et du 3O,4N-B, le mutant $\Delta coq9/Coq8$ accumule de l'IDMQ₆ mais également de la DMQ₆ (figure 67B); ce dernier pouvant provenir soit d'une déamination peu efficace dans $\Delta coq9/Coq8$ soit du 4-HB endogène qui est en compétition avec l'AMB et le 3O,4N-B pour entrer dans la biosynthèse de Q₆.

Il est intéressant de signaler que le contenu en IDMQ₆ des mutants $\Delta coq6/Coq8$ et $\Delta coq9/Coq8$ cultivés en présence du 3O,4N-B est plus élevé que celui provenant de l'AMB (figure 67). De même la quantité de coenzyme Q₆ synthétisée dans une souche WT à partir du 3O,4N-B est plus importante que celle formée à partir de l'AMB (figure 66). Ainsi, il semble que le 3O,4N-B soit un meilleur précurseur que l'AMB pour la biosynthèse du coenzyme Q₆ et il est possible que cette différence soit due à une prénylation plus efficace de 3O,4N-B que de l'AMB.

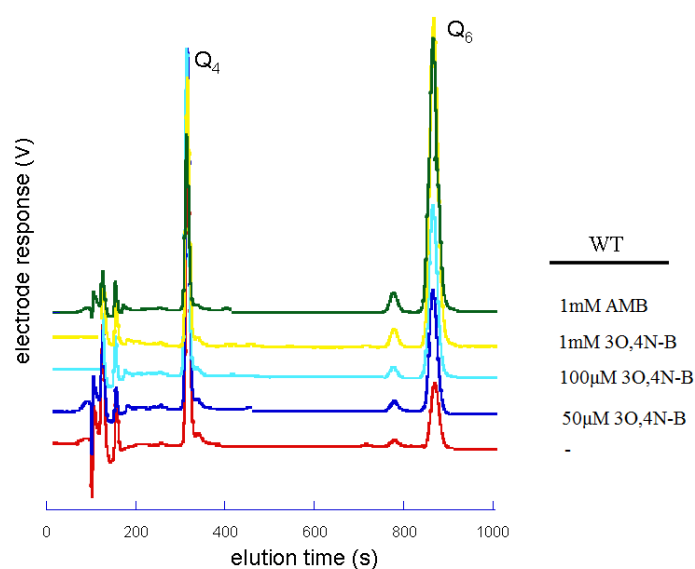


Figure 66: Le 3O,4N-B et l'AMB sont des précurseurs du coenzyme Q₆. La souche WT a été cultivée en YNB-P 2% glucose contenant ou non les concentrations indiquées du 3O,4N-B et de l'AMB. Les extraits lipidiques de 2 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

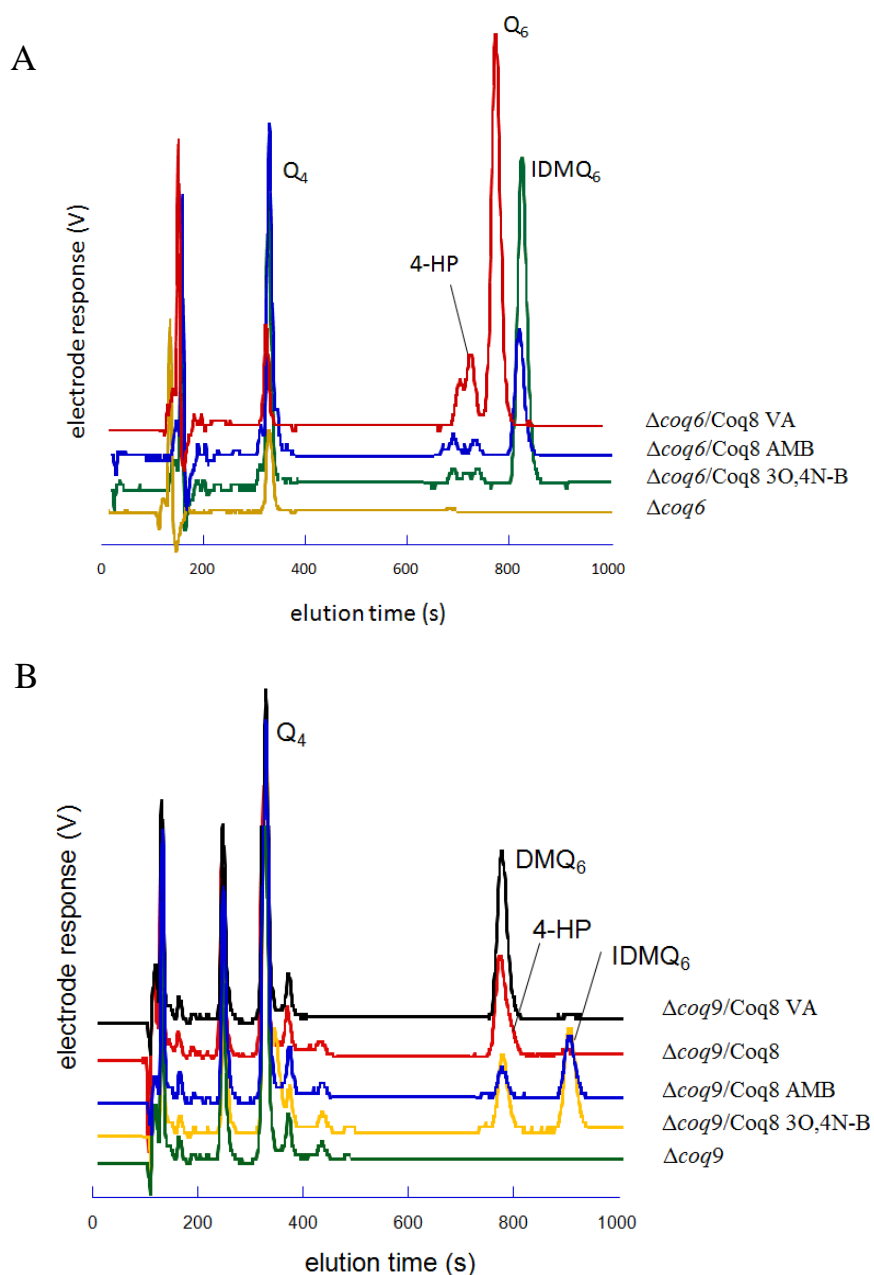
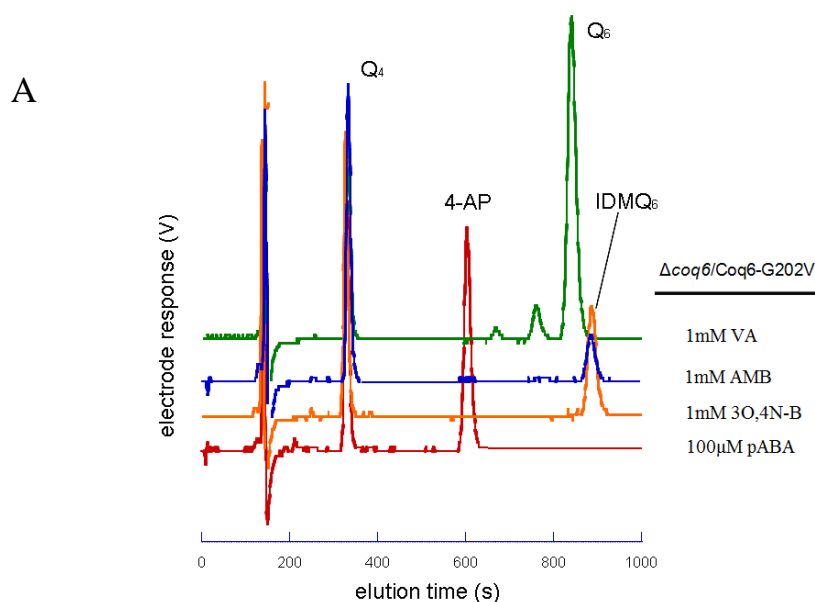


Figure 67: Accumulation de l'IDMQ₆ dans les mutants $\Delta coq6/Coq8$ et $\Delta coq9/Coq8$ en présence du 3O,4N-B et de l'AMB. Les mutants $\Delta coq6(A)$ et $\Delta coq9(B)$ surexprimant ou non Coq8 ont été cultivés en YNB-P 2% glucose contenant ou non 1 mM 3O,4N-B, 1 mM AMB ou 1 mM VA. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

I.2. Gal-YAH1 et les mutants ponctuels *coq6* accumulent aussi de l'IDMQ₆

Nous avons ensuite testé l'effet d'analogues de pABA sur les souches Gal-YAH1 et $\Delta coq6/Coq6\text{-G202V}$. Aucune formation de coenzyme Q₆ n'a été observée dans ces souches en présence du 3O,4N-B ou de l'AMB (figure 68). De même que dans le mutant $\Delta coq6/Coq8$, les souches Gal-YAH1 et $\Delta coq6/Coq6\text{-G202V}$ accumulent de l'IDMQ₆ en présence d'analogues du pABA et comme attendu, ces souches synthétisent du coenzyme Q₆ à partir de VA (figure 68).

Ainsi, ces résultats confirment le défaut de déamination dans ces souches et suggèrent fortement une concomitance entre l'hydroxylation en C5 et la déamination en C4.



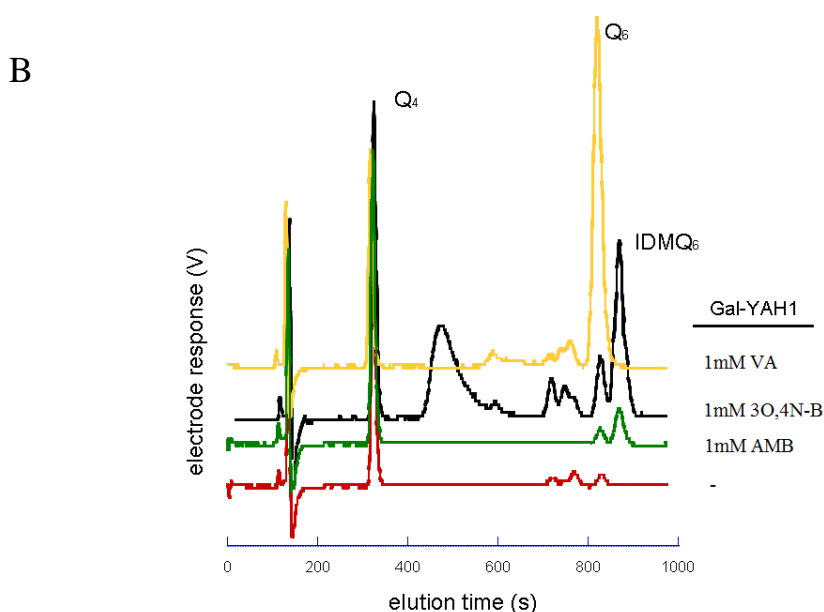


Figure 68: Accumulation de l'IDMQ₆ dans les souches Gal-YAH1 et $\Delta coq6/Coq6$ -G202V cultivées en présence du 3O,4N-B et de l'AMB. Le mutant $\Delta coq6/Coq6$ -G202V(A) et la souche Gal-YAH1(B) ont été cultivés en YNB-P 2% glucose contenant ou non les concentrations indiquées de 3O,4N-B, de l'AMB et de VA. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

I.3. Accumulation de la DDMQ₆ et de la DMQ₆ dans les mutants $\Delta coq5/Coq8$ et $\Delta coq7/Coq8$ respectivement

Nous avons montré l'accumulation de la DDMQ₆ et la DMQ₆ dans les mutants $\Delta coq5/Coq8$ et $\Delta coq7/Coq8$ même en présence du pABA comme précurseur indiquant ainsi que la déamination se fait dans ces mutants. Nous avons donc testé l'effet d'analogues de pABA sur ces mutants.

Comme attendu, en présence du 3O,4N-B ou de l'AMB, la quantité accumulée de la DDMQ₆ et de la DMQ₆ augmente (figure 69), confirmant ainsi que la déamination se fait efficacement dans ces mutants. En fait, aucune forme aminée de la DDMQ₆ ou de la DMQ₆ n'a été détectée. Il faut noter que dans quelques expériences, nous avons détecté un produit que nous pensons être du HHAB (figure 69) et qui résulte probablement de l'excès du 3O,4N-B. L'identité du HHAB est compatible avec son temps de rétention et l'aspect dissymétrique du pic d'élution

qui est observée, dans nos conditions chromatographiques, pour des composés contenant un groupement carboxylate.

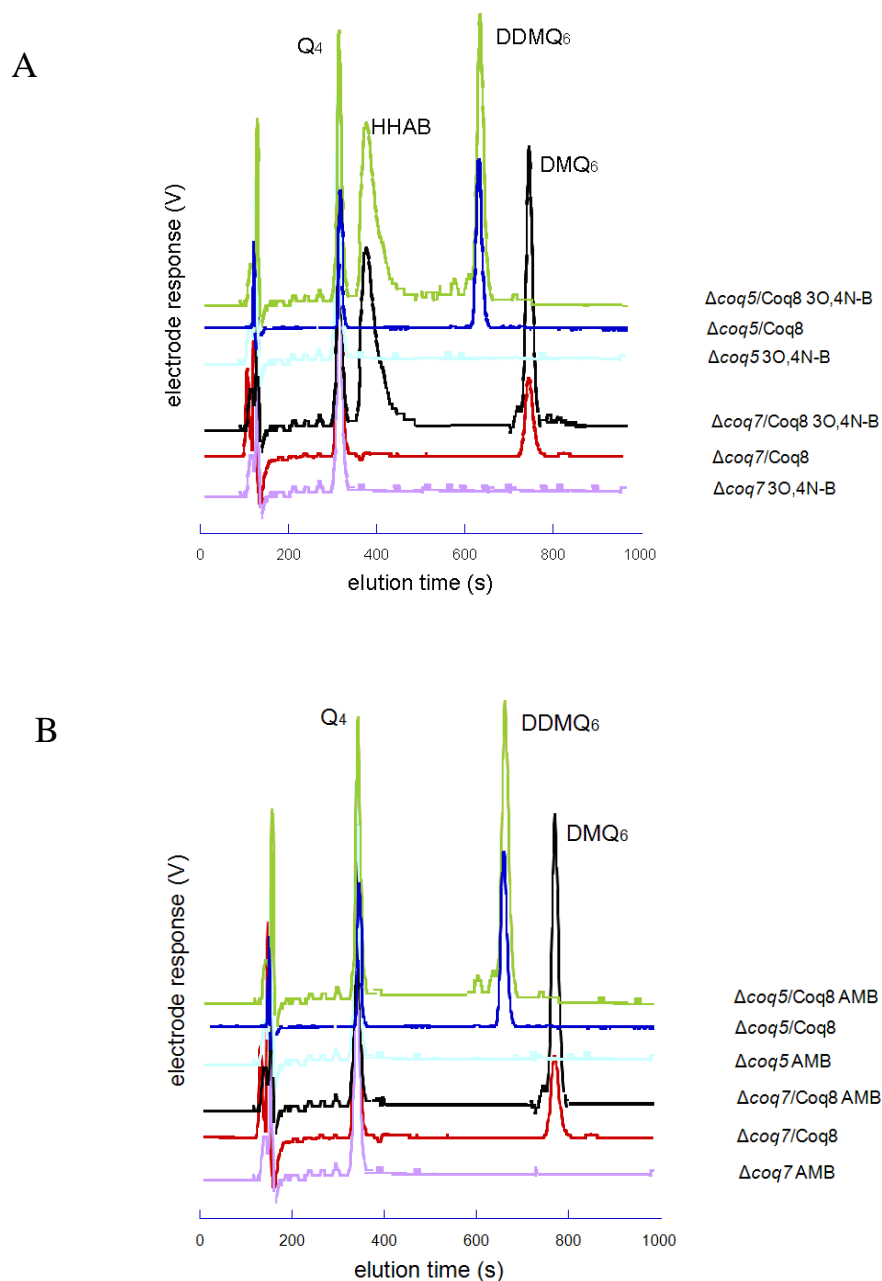


Figure 69: Accumulation de la DDMQ₆ et de la DMQ₆ dans les mutants $\Delta coq5/Coq8$ et $\Delta coq7/Coq8$ en présence du 3O,4N-B et de l'AMB. Les mutants $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$ surexprimant ou non Coq8 ont été cultivés en YNB-P 2% glucose contenant ou non 1 mM 3O,4N-B (A) ou 1 mM AMB (B). Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

I.4. Accumulation de l'IDMQ₆ dans les mutants $\Delta coq3/Coq8$ en présence de l'AMB

En ajoutant le 3O,4N-B dans le milieu de culture des mutants $\Delta coq3/Coq8$ et $\Delta coq4/Coq8$, nous avons détecté uniquement du HHAB (figure 70A). Ce résultat est en accord avec le défaut de la méthylation en O5 présent dans ces mutants.

Cependant, en présence de l'AMB, le mutant $\Delta coq3/Coq8$ accumule de l'IDMQ₆ (figure 70B) suggérant ainsi un défaut de déamination dans ce mutant. Par contre, aucun intermédiaire électroactif n'est accumulé dans $\Delta coq4/Coq8$ (figure 70B).

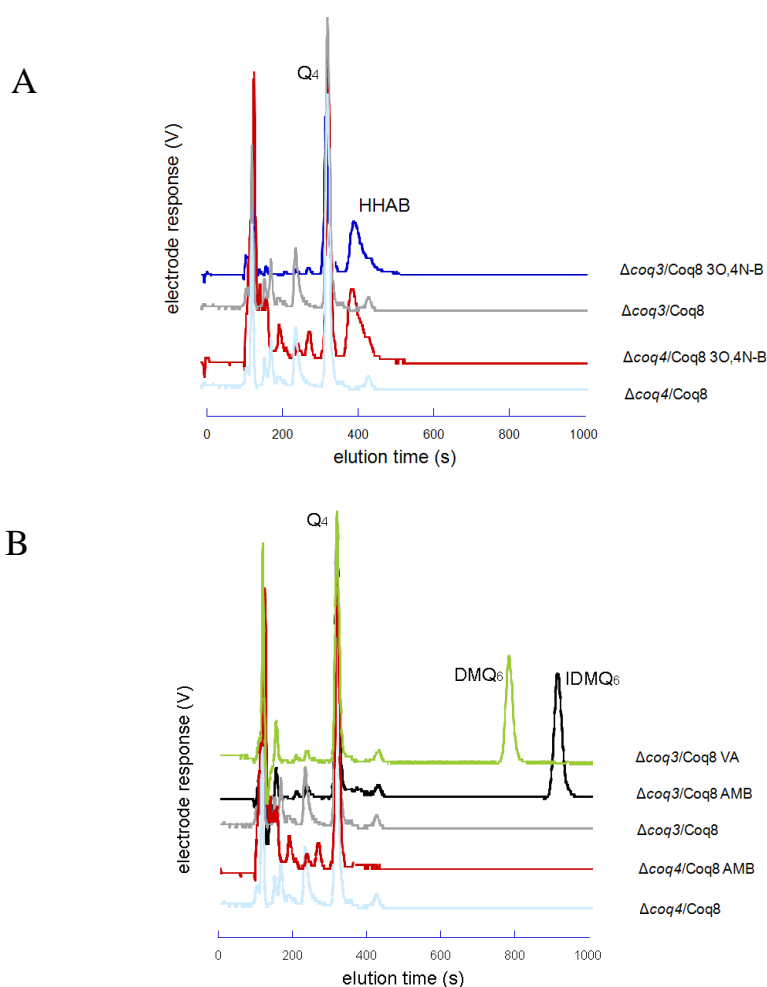


Figure 70: Accumulation de l'IDMQ₆ dans $\Delta coq3/Coq8$ en présence de l'AMB. Les mutants $\Delta coq3$ et $\Delta coq4$ surexprimant Coq8 ont été cultivés en YNB-P 2% glucose contenant ou non 1 mM 3O,4N-B (A) ou 1 mM AMB ou 1 mM VA (B). Les extraits lipidiques de 6 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

L'ensemble des résultats de la partie I confirment donc le défaut de déamination dans les mutants $\Delta coq6$, $\Delta coq9$ et dans la souche Gal-YAH1 ainsi que l'absence de ce défaut dans les mutants $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$. En outre, l'accumulation de l'IDMQ₆ dans $\Delta coq3/Coq8$ cultivé en présence de l'AMB suggère aussi l'existence d'un défaut pour la déamination et confirme la déficience d'hydroxylation en C5 dans ce mutant.

II. Essai d'identification de la déaminase

II.1. Stratégie suivie pour identifier la déaminase

Nous avons ensuite cherché à identifier la déaminase impliquée dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆. Nous nous sommes focalisés sur l'étude d'un mutant qui montre un défaut de déamination, le mutant $\Delta coq6/Coq8$.

Suite à nos données montrant l'accumulation de l'IDMQ₆ dans ce mutant en présence du 3O,4N-B (figure 67A), nous avons testé la capacité de l'IDMQ₆ à compléter la déficience respiratoire du mutant $\Delta coq6/Coq8$ (figure 71). La souche $\Delta coq6$ transformée avec un vecteur vide, ou par des vecteurs codant pour Coq8 et Coq6 pousse sur glucose (figure 71). Comme précédemment établi, la surexpression de Coq8 rétablit la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans $\Delta coq6$ en présence de VA permettant ainsi la croissance sur LG 1mM VA (figure 71). En revanche, la souche $\Delta coq6/Coq8$ n'est pas capable de croître sur LG 1mM 3O,4N-B (figure 71) démontrant ainsi que l'IDMQ₆ n'est pas capable de transférer efficacement des électrons dans la chaîne respiratoire.

Coq7 est stable et active dans $\Delta coq6/Coq8$ ce qui est évident par le rétablissement de la biosynthèse du coenzyme Q₆ à partir de VA dans ce mutant (figure 67A). Dans le mutant $\Delta coq6/Coq8$ cultivé en présence de 3O,4N-B, l'accumulation de l'IDMQ₆ et l'absence de synthèse d'imino-Q₆ ou d'imino-C6-déméthyl-Q₆ (figure 67A) suggère que Coq7 n'est pas capable de catalyser l'hydroxylation en C6 lorsqu'un groupement amine est présent en C4 en remplacement du groupement hydroxyle habituel. Notre hypothèse est donc que l'IDMQ₆ n'est pas reconnu par Coq7 ou inhibe Coq7 dans la souche $\Delta coq6/Coq8$ cultivée en présence du 3O,4N-B. En revanche, si l'IDMQ₆ est converti en DMQ₆ par la déaminase alors Coq7 pourra hydroxyler la DMQ₆ et conduire à la synthèse de Q₆.

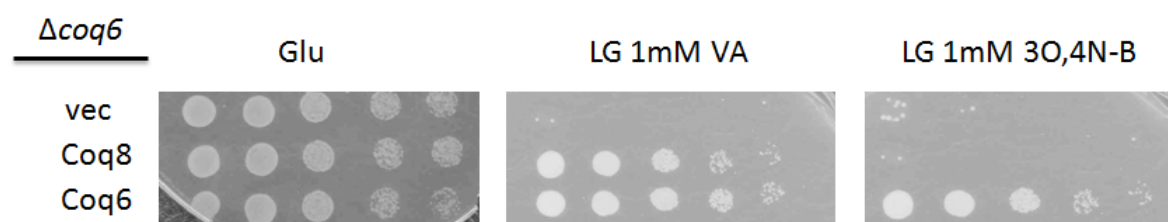


Figure 71: Expérience de dilution en série montrant l'incapacité du 3O,4N-B à rétablir la respiration dans le mutant $\Delta coq6/Coq8$. La souche $\Delta coq6$ transformée, soit avec un vecteur vide (vec), un vecteur contenant COQ8 (Coq8) ou avec un vecteur contenant COQ6 (Coq6) a été cultivée en YNB-P 2% glucose pendant 24 heures. Après rinçage des cellules avec de l'eau distillée, des dilutions en série ont été déposées sur des boîtes de gélose. Les boîtes contiennent de l'YNB-P-agar supplémenté avec 2% de glucose (Glu) ou de 2% de lactate-glycérol (LG) additionné par les concentrations indiquées du VA ou du 3O,4N-B. Les boîtes ont été incubées pendant 2 jours (Glu) ou 4 jours (LG) à 30°C.

Pour expliquer l'absence d'activité déaminase dans $\Delta coq6/Coq8$, notre hypothèse était donc que la déaminase est instable dans cette souche. Ainsi, nous avons envisagé que la surexpression de la déaminase dans $\Delta coq6/Coq8$ pourrait stabiliser en partie cette protéine et donc de rétablir une activité déaminase qui permettrait de ne plus accumuler de l'IDMQ₆ en présence de 3O,4N-B, mais bien de promouvoir la synthèse d'intermédiaires hydroxylés qui seraient converti en coenzyme Q₆.

Notre stratégie a donc été de transformer une banque de surexpression d'ADN génomique de *S. cerevisiae* dans la souche $\Delta coq6/Coq8$ dans le but de surexprimer la déaminase qui permettrait de convertir l'amine C4 en hydroxyle et donc de rétablir à la fois la biosynthèse du coenzyme Q₆ et la croissance sur milieu respiratoire en présence de 3O,4N-B (figure 72).

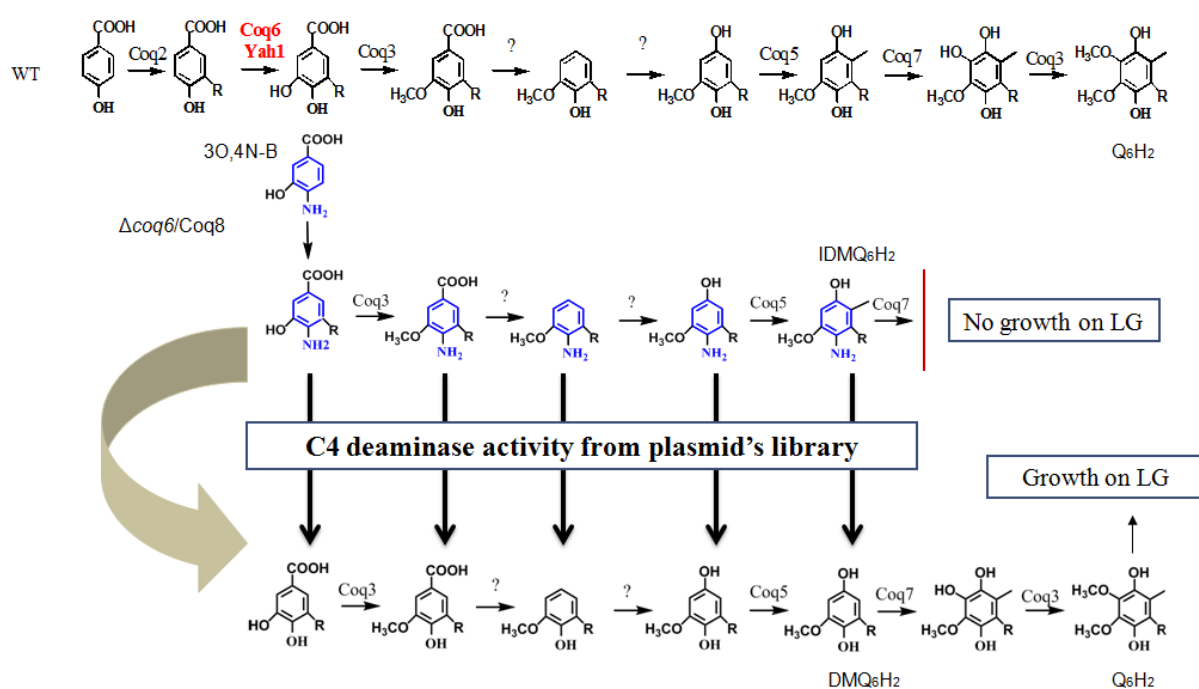


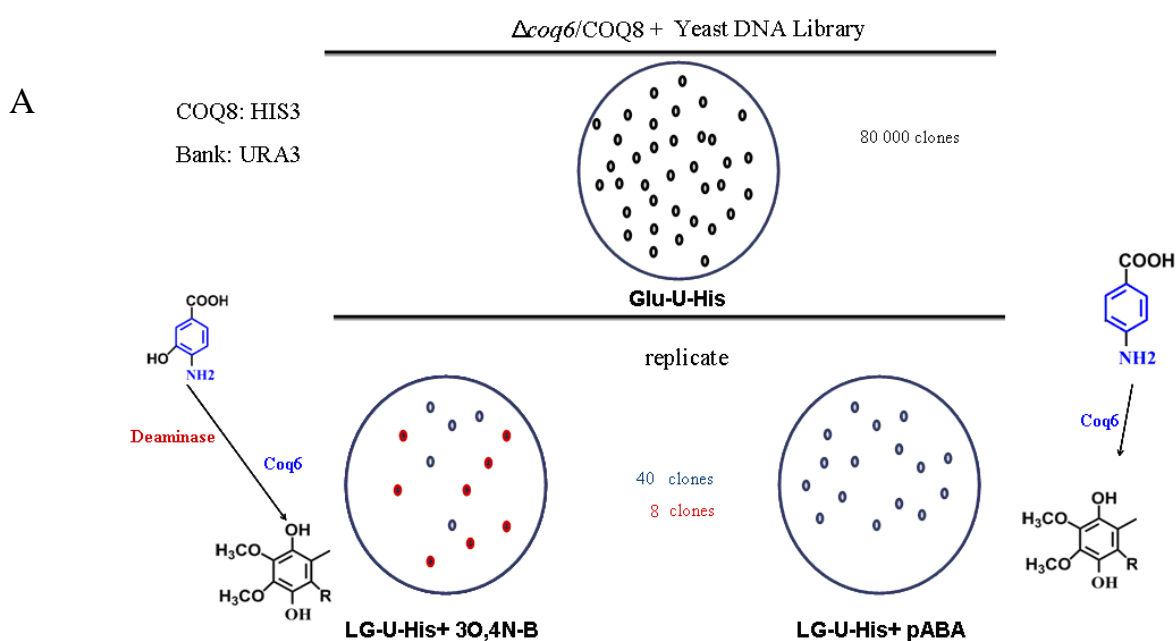
Figure 72: Schéma de la stratégie mise en place pour tenter d'identifier la déaminase.

II.2. Crible génétique

Nous avons donc transformé dans le mutant $\Delta coq6/Coq8$ (le plasmide exprimant Coq8 possède un marqueur His3) une banque précédemment construite dans un vecteur Ura3 multi-copie avec de l'ADN génomique provenant d'une souche $\Delta coa1$ (Coa1 est une protéine membranaire impliquée dans l'assemblage du complexe IV (Pierrel et al, 2007)). Un schéma représentatif du crible est illustré dans la figure 73. Nous avons obtenu un grand nombre de transformants (80 000 clones) montrant une croissance sur Glu-U-His.

Afin de sélectionner les transformants, une réplique sur milieu respiratoire contenant soit 1mM 3O,4N-B (LG-U-His + 3O,4N-B) soit 1mM pABA (LG-U-His + pABA) a été ensuite réalisée. En fait, les clones qui montrent une croissance sur LG-U-His + pABA vont sûrement contenir un plasmide portant le gène COQ6. Par contre, les clones qui poussent sur LG-U-His + 3O,4N-B vont contenir soit COQ6, soit le gène codant pour la déaminase qui va convertir l'amine C4 des intermédiaires de biosynthèse de Q₆ issus du 3O,4N-B en hydroxyle C4 et par suite libérer Coq7 ce qui permettra la croissance sur LG (figure 73). Ainsi, en comparant les deux répliques, nous

avons sélectionnés deux types de clones: les clones qui poussent sur LG-U-His + 3O,4N-B, représentés en rouge sur la figure 73A, contiennent probablement le gène codant pour la déaminase et ceux qui poussent sur LG-U-His + 3O,4N-B aussi bien que sur LG-U-His + pABA, représentés en bleu sur la figure 73A contiennent COQ6.



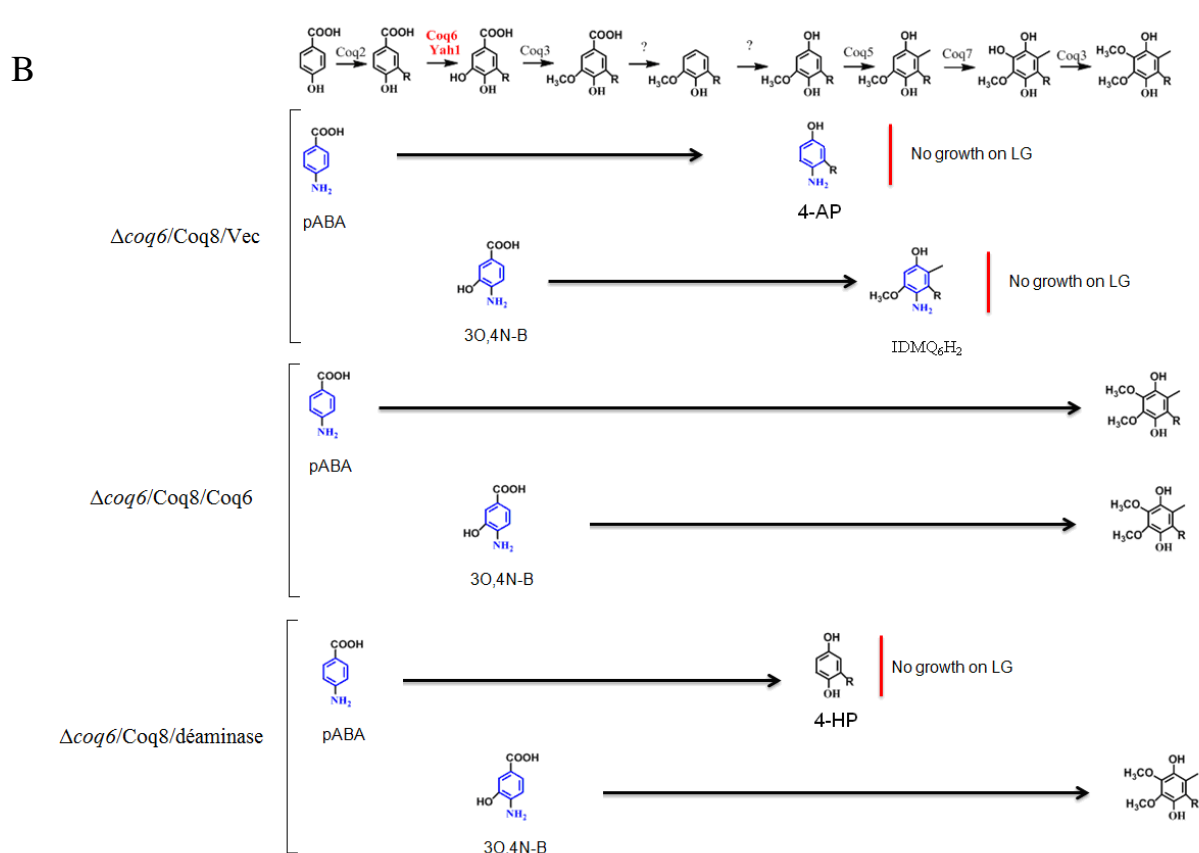


Figure 73: Schémas représentant les intermédiaires de biosynthèse produits par les candidats du crible génétique réalisé pour identifier le gène codant pour la déaminase. (A) Schéma représentatif de la transformation de la banque de surexpression et des répliques réalisées. Les points représentent les transformants. (B) Prévion des intermédiaires de biosynthèse accumulés dans les différents types de clones issus du crible en fonction des précurseurs (pABA ou 3O,4N-B) présents dans le milieu.

II.3. Isolation des clones intéressants

A la suite de ce crible, nous avons réussi à isoler huit colonies qui montrent une bonne croissance sur YNB LG-U-His + 3O,4N-B comparée au milieu YNB LG-U-His + pABA. De plus, 40 clones ont montré une croissance comparable sur YNB LG-U-His + 3O,4N-B ou YNB LG-U-His + pABA. Un rétalement des cellules a été ensuite effectué pour confirmer les phénotypes des clones obtenus et est présenté en figure 74. Selon leur phénotype, les clones sont classifiés en deux catégories: Les clones de la catégorie A montrent une bonne croissance sur

YNB LG-U-His + 3O,4N-B par rapport à YNB LG-U-His + pABA alors que les clones de la catégorie D montrent une croissance comparable sur YNB LG-U-His + 3O,4N-B ou YNB LG-U-His + pABA.

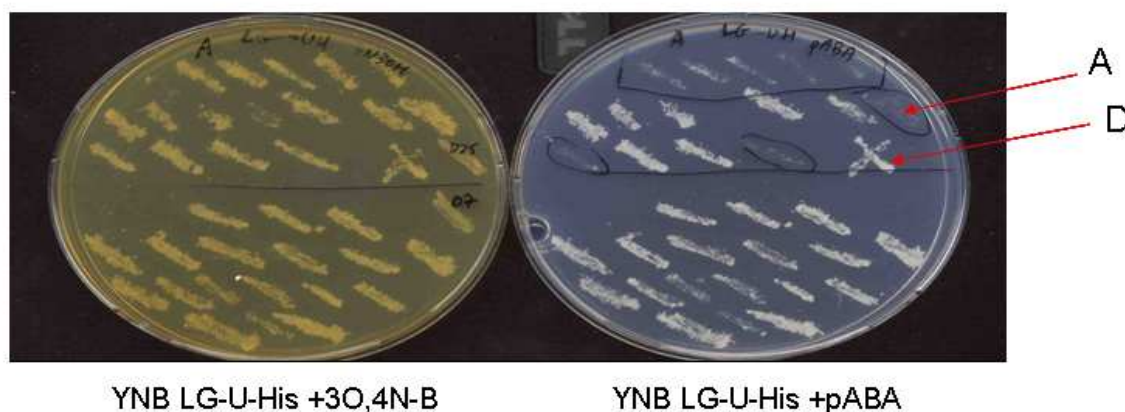


Figure 74: Isolation des clones qui montrent une croissance sur YNB LG-U-His + 3O,4N-B mais pas sur YNB LG-U-His + pABA. Les clones ont été étalés sur les boîtes à l'aide des bâtonnets stérilisés. Les boîtes ont été incubées pendant 4 jours à 30°C.

III. Caractérisation des clones candidats

III.1. Le phénotype des clones est dû à la présence des plasmides

Afin de s'assurer que la croissance des clones sur LG-U-His + 3O,4N-B est due à la présence du plasmide de la banque, les cellules ont été traitées à l'acide 5-fluoro-orotique (5-FOA). Le gène URA3, porté par les plasmides de la banque de surexpression, code pour l'orotidine 5'-phosphate décarboxylase qui est impliquée dans la synthèse de l'uracile. Le 5-FOA est converti par Ura3 en 5-fluorouracil qui est toxique pour les cellules. Ainsi, les cellules exprimant Ura3 sont incapables de survivre en présence de 5-FOA alors que les cellules qui n'expriment pas Ura3 survivent car elles ne métabolisent pas le 5-FOA. Des cellules qui contiennent le gène URA3 sur un plasmide ont donc tendance à perdre ce plasmide lorsqu'elles sont étalées sur un milieu contenant du 5-FOA afin de pouvoir survivre. Ces cellules deviennent

donc auxotrophes pour l'uracile. Après deux étalements successifs sur un milieu contenant du 5-FOA, la capacité de 3 clones ($\Delta coq6/Coq8/D1$, $\Delta coq6/Coq8/A2$ et $\Delta coq6/Coq8/A17$) à pousser sur un milieu sans uracile et sur milieu respiratoire a été testée.

Les clones sélectionnés sur 5-FOA ont certainement perdu le plasmide contenant le gène URA3 provenant de la banque car les cellules poussent sur YNB-P-His Glu mais pas sur YNB-P-U-His Glu (figure 75A). Comme attendu, tous les clones poussent sur milieu respiratoire contenant de VA (figure 75B) mais seuls ceux qui n'ont pas été sélectionnés sur 5-FOA ont la capacité de pousser sur YNB-P-His LG 100 μ M pABA ou YNB-P-His LG 1 mM 3O,4N-B (figure 75C). Ainsi, il semble que la croissance observée sur YNB-P-His LG 1 mM 3O,4N-B des clones avant sélection sur 5-FOA soit associée à l'insert d'ADN génomique porté par le plasmide de la banque.

Le clone $\Delta coq6/Coq8/D1$ contient le gène COQ6 dans le plasmide provenant de la banque (voir séquençage) et il montre une croissance sur YNB-P-His LG 100 μ M pABA comparable à celle observée sur YNB-P-His LG 1 mM 3O,4N-B (figure 75C). Deux clones intéressants ($\Delta coq6/Coq8/A2$ et $\Delta coq6/Coq8/A17$) montrent une bonne croissance sur YNB-P-His LG 1 mM 3O,4N-B et une croissance beaucoup plus faible sur YNB-P-His LG 100 μ M pABA (figure 75C) indiquant ainsi que ces clones peuvent contenir le gène codant pour la déaminase.

Il est important de signaler que les clones non sélectionnés sur 5-FOA poussent sur milieu respiratoire sans additif (YNB-P-His LG) (figure 75B) suggérant ainsi que ces clones peuvent synthétiser du coenzyme Q₆ à partir du 4-HB endogène.

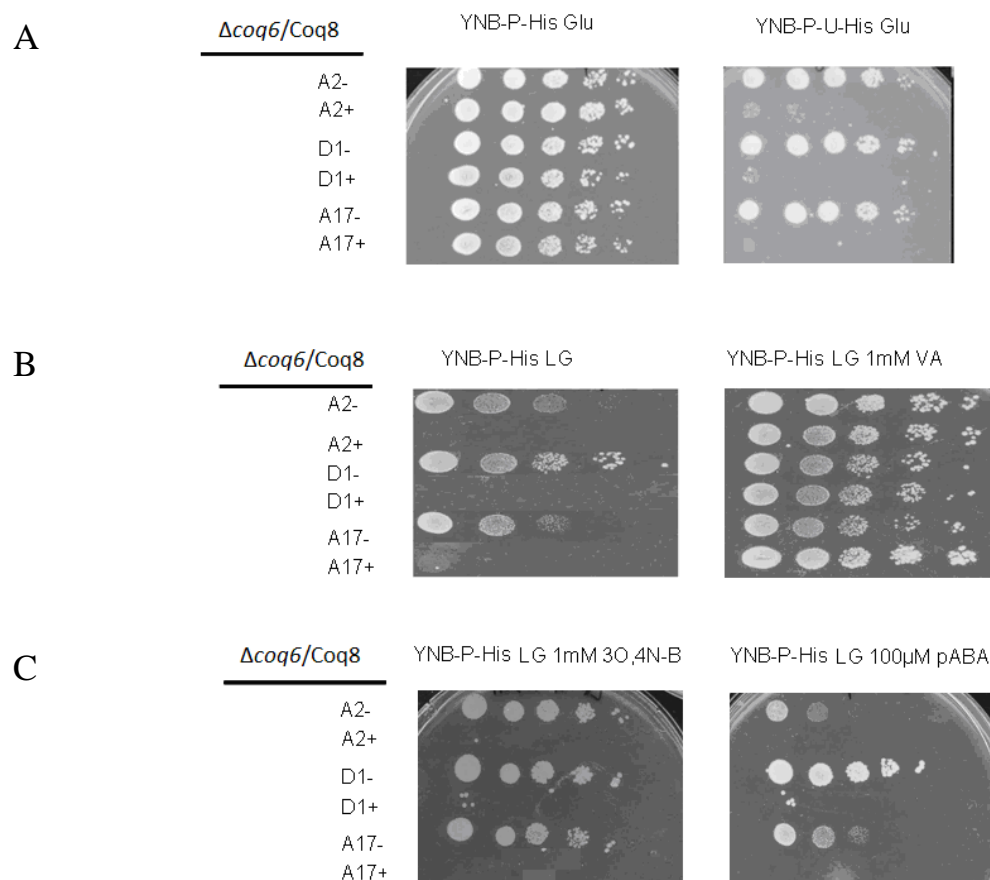


Figure 75: Perte des capacités respiratoires des clones après traitement au 5-FOA. Les différents clones sélectionnés sur 5-FOA (+) ou non (-), ont été cultivés en YNB-P 2% glucose pendant 24 heures. Après rinçage des cellules avec de l'eau distillée, des dilutions en série ont été déposées sur des boîtes de gélose. Les boîtes contiennent de l'YNB-P-agar supplémenté avec 2% de glucose (Glu) ou de 2% de lactate-glycérol (LG) et les concentrations indiquées de VA, 3O,4N-B et pABA. Les boîtes ont été incubées pendant 2 jours (Glu) ou 4 jours (LG) à 30°C.

III.2. Mesure du contenu des clones en coenzyme Q_6

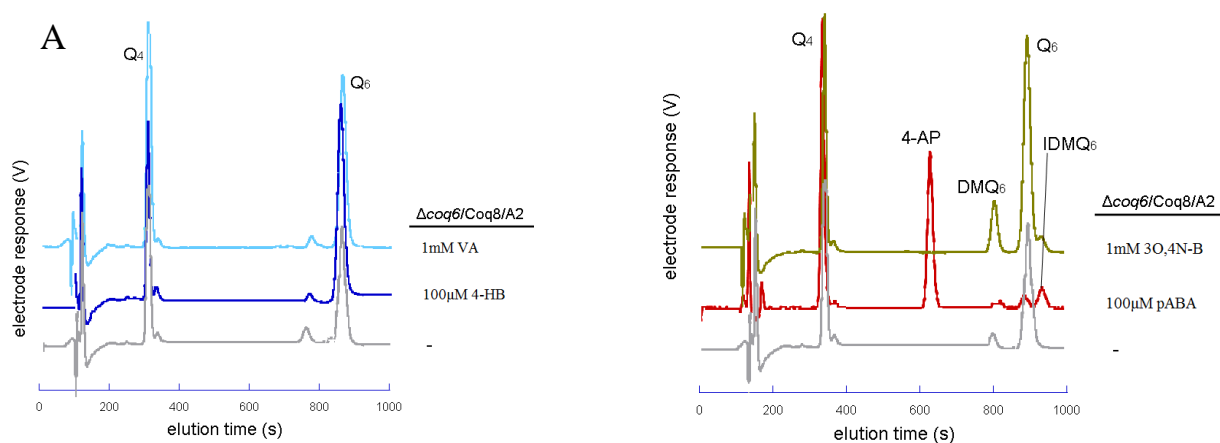
Nous avons ensuite mesuré le contenu des clones $\Delta coq6/Coq8/A2$, $\Delta coq6/Coq8/A17$ et $\Delta coq6/Coq8/D1$ en coenzyme Q_6 . Comme le montre la figure 76, $\Delta coq6/Coq8/A2$ (A) et $\Delta coq6/Coq8/A17$ (B) synthétisent du coenzyme Q_6 en présence du 3O,4N-B tout en montrant une accumulation résiduelle d'IDMQ₆.

Comme attendu, une très faible quantité de coenzyme Q₆ est détectée lorsque les cellules sont cultivées en présence de pABA. Cependant, une accumulation importante de 4-AP est observée ainsi qu'une quantité plus faible d'IDMQ₆ (figure 76).

Conformément aux résultats obtenus avec l'expérience de dilution en série, les clones $\Delta coq6/Coq8/A2$ et $\Delta coq6/Coq8/A17$ synthétisent du coenzyme Q₆ à partir du 4-HB endogène (sans additif) (figure 76). De plus, le contenu en coenzyme Q₆ des clones augmente légèrement en ajoutant 100 μ M 4-HB ou 1 mM VA ou 3O,4N-B dans le milieu de culture (figure 76).

Le contenu des clones en coenzyme Q₆ est parfaitement en accord avec leur croissance sur milieu respiratoire. En effet, ces clones étaient incapables de croître sur un milieu respiratoire contenant du pABA contrairement aux milieux respiratoires supplémentés par du 4-HB, VA ou 3O,4N-B démontrant que la croissance sur le milieu respiratoire utilisé est proportionnelle à la quantité de Q₆ présente dans les cellules.

Il est également important de signaler que le clone $\Delta coq6/Coq8/D1$ synthétise du coenzyme Q₆ (80% par rapport à une souche WT) dans toutes les conditions de culture (pABA, 4-HB, 3O,4N-B et AMB) (figure 81).



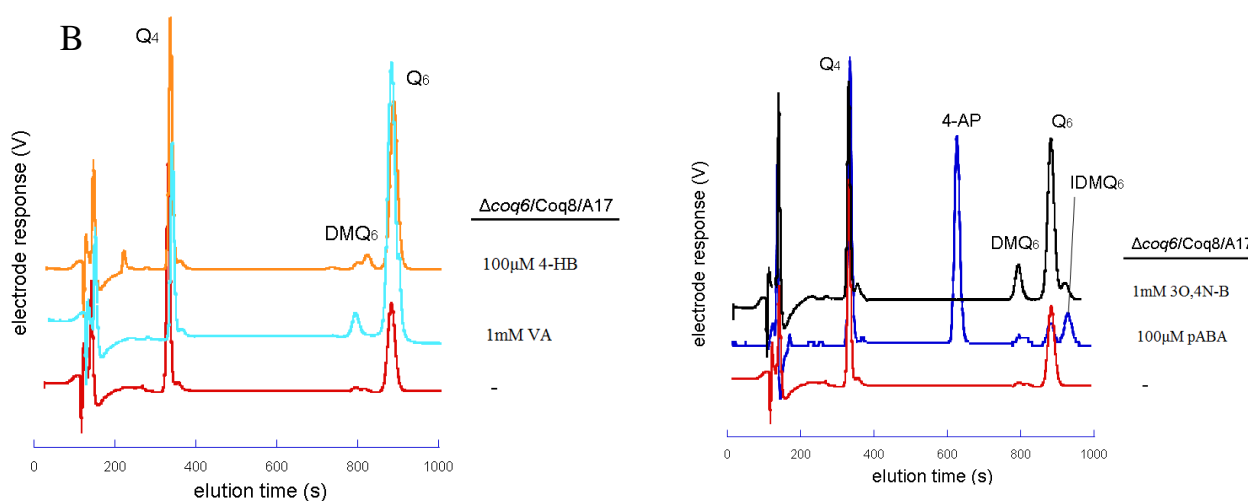


Figure 76: Synthèse de coenzyme Q_6 dans $\Delta coq6/Coq8/A2$ et $\Delta coq6/Coq8/A17$ en présence du 3O,4N-B. Les cellules $\Delta coq6/Coq8/A2$ (A), $\Delta coq6/Coq8/A17$ (B) ont été cultivées en YNB-P 2% glucose contenant ou non les concentrations indiquées de pABA, 4-HB, VA ou 3O,4N-B. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

Collectivement, nos résultats montrent que les clones $\Delta coq6/Coq8/A2$ et $\Delta coq6/Coq8/A17$ sont capables de réaliser l'hydroxylation en C5 sur des intermédiaires de biosynthèse provenant du 4-HB mais pas sur ceux provenant du pABA car le produit majoritairement formé dans ce cas est le 4-AP qui est caractéristique d'un défaut d'hydroxylation en C5. Les résultats sont clairs mais le devenir du 3O,4N-B dans $\Delta coq6/Coq8/A2$ et $\Delta coq6/Coq8/A17$ est beaucoup plus problématique. En effet, la quantité de coenzyme Q_6 formée en présence de 3O,4N-B n'est que modestement supérieure à celle formée sans ajout de précurseurs dans le milieu. Ainsi, la majorité du coenzyme Q_6 formé en présence de 3O,4N-B pourrait en fait provenir du 4-HB endogène. Des expériences avec du 3O,4N-B marqué que nous n'avons malheureusement pas à notre disposition pourrait nous permettre de régler cette question.

III.3. Séquençage

Une préparation d'ADN (contenant l'ADN génomique et l'ADN plasmidique) des clones $\Delta coq6/Coq8/A2$, $\Delta coq6/Coq8/A17$ et $\Delta coq6/Coq8/D1$ a été effectuée et l'ADN purifié a été

ensuite transformé dans des bactéries compétentes *E. coli DH5α* afin d'amplifier les plasmides. Les plasmides ont été ensuite extraits des bactéries et digérés par les enzymes de restrictions. En fait, le profil de restriction des plasmides permet de différencier les plasmides contenant le gène COQ8 de ceux provenant de la banque. En effet, seuls les plasmides qui ne montrent pas une bande à la taille correspondante à celle de COQ8 après digestion, proviennent de la banque et sont donc envoyés au séquençage.

Le résultat du séquençage a montré que le plasmide de la banque des clones $\Delta coq6/Coq8/A2$ et $\Delta coq6/Coq8/A17$ contient un insert d'ADN génomique qui comporte le gène COQ6 (figure 77). Cependant, dans ces deux clones, l'ORF de COQ6 n'est pas entière car il manque respectivement 27 et 48 nucléotides dans les plasmides des clones $\Delta coq6/Coq8/A2$ et $\Delta coq6/Coq8/A17$. Comme conséquence, il y a 9 acides aminés qui manquent dans la partie C-terminale de Coq6 provenant de $\Delta coq6/Coq8/A2$ et 16 acides aminés manquant dans Coq6 provenant du clone $\Delta coq6/Coq8/A17$ (figure 77 et figure 78). Les plasmides contenant ces formes tronquées de Coq6 ont été ainsi nommés Coq6 Δ 9 et Coq6 Δ 16. Il faut cependant signaler qu'à cause de l'absence du codon stop à la fin de l'ORF de COQ6, il est vraisemblable qu'une partie des nucléotides de plasmides soient traduit à la suite des nucléotides de l'ORF tronquée de Coq6. Ainsi, ces formes, dites tronquées, pourrait en fait contenir une extension C-terminale dont la séquence est: DSRGSPGTELES (figure 77).

Comme attendu, $\Delta coq6/Coq8/D1$ contient le gène entier codant pour Coq6.

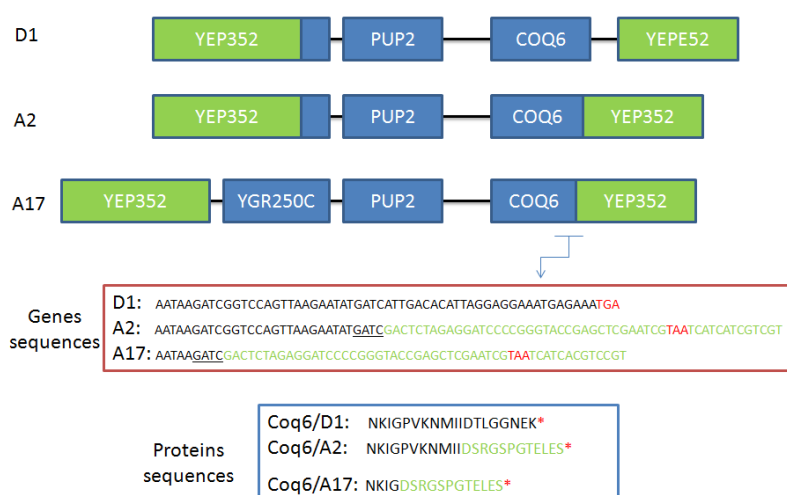


Figure 77: Schéma représentatif des inserts d'ADN génomique présents dans les plasmides provenant des clones $\Delta coq6/Coq8/D1$, $\Delta coq6/Coq8/A2$ et $\Delta coq6/Coq8/A17$. Les rectangles bleus

représentent les ORF des gènes et les verts représentent le plasmide YEP352. Le cadre rouge contient les séquences nucléotidiques de la partie 3' de COQ6. Les nucléotides rouges indiquent les codons STOP, ceux en vert proviennent du plasmide YEP352 et ceux soulignés correspondent au site de restriction de l'enzyme utilisé pour créer la banque (Sau3A). Le cadre bleu contient la séquence C-terminale de la protéine Coq6 (en noire) fusionnée à la séquence (en vert) provenant de la traduction des nucléotides du plasmide. Les étoiles * marquent la fin prévisible des séquences.

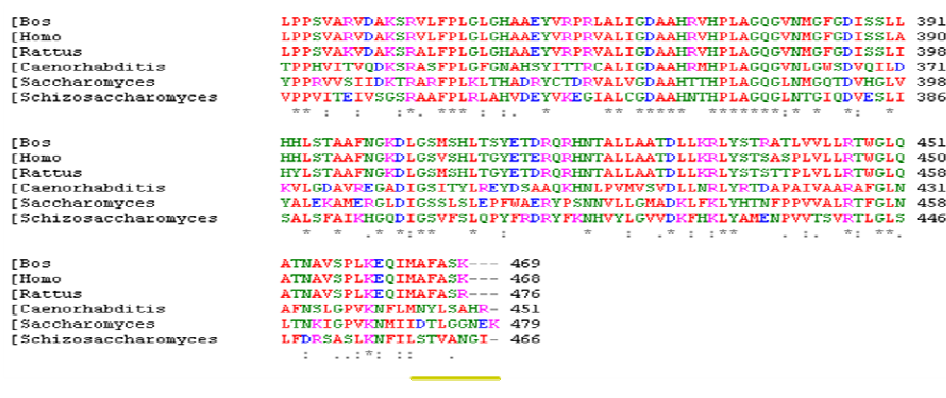


Figure 78: Alignement de séquence des 80 derniers acides aminés des protéines Coq6 de différents organismes. Le trait jaune indique les 9 acides aminés manquant dans Coq6 Δ 9 et le trait rouge ceux manquants dans Coq6 Δ 16. Les étoiles * représentent les acides aminés conservés chez les différents organismes.

III.4. Transformation de Coq6 Δ 9 et Coq6 Δ 16 dans Δ coq6

Nous avons ensuite transformé les plasmides Coq6 Δ 9 et Coq6 Δ 16 dans le mutant Δ coq6. Comme le montre la figure 79, le mutant Δ coq6 transformé synthétise du coenzyme Q₆ à partir du 4-HB et de 3O,4N-B et accumule les mêmes intermédiaires trouvés dans les clones Δ coq6/Coq8/A2 et Δ coq6/Coq8/A17 (figure 79).

Pour exclure un potentiel rôle de Coq8 dans les phénotypes observés des clones A2 et A17, nous avons surexprimé Coq8 dans Δ coq6/Coq6 Δ 9 et Δ coq6/Coq6 Δ 16. Aucun effet de la surexpression de Coq8 n'a été observé. Δ coq6/Coq6 Δ 9/Coq8 et Δ coq6/Coq6 Δ 16/Coq8 accumulent les mêmes intermédiaires que les souches Δ coq6/Coq6 Δ 9 et Δ coq6/Coq6 Δ 16 (figure 80). Puisque la surexpression de Coq8 est sans effet, nous proposons qu'elle ne permet pas d'augmenter la stabilité des protéines Coq dans les souches Δ coq6/Coq6 Δ 9 et Δ coq6/Coq6 Δ 16 car cette stabilité est déjà maximale. Cette proposition est en accord avec le fait qu'une quantité équivalente de coenzyme Q₆ est synthétisé en présence de VA dans les souches Δ coq6/Coq6 Δ 9

et $\Delta coq6/Coq6\Delta16$ surexprimant ou non Coq8 (figure 81). Ainsi, ces résultats suggèrent fortement que les protéines Coq6 tronquées sont en partie stables.

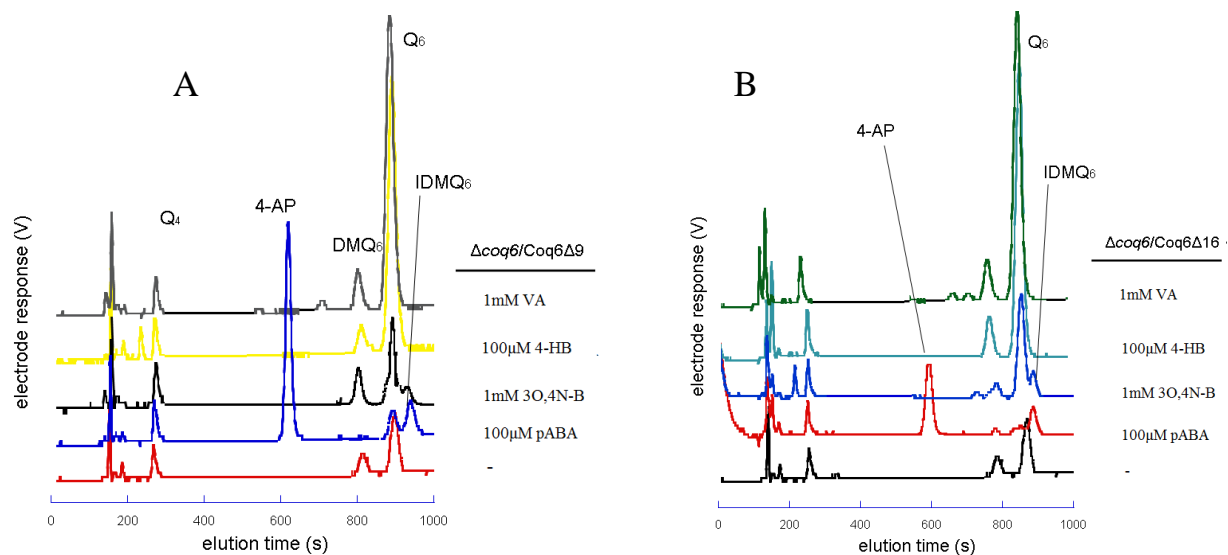


Figure 79: La surexpression de Coq6 Δ 9 et Coq6 Δ 16 rétablit la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans les mutants $\Delta coq6$ en présence des précurseurs hydroxylés en C4. Les cellules $\Delta coq6/\Delta$ 9 (A) et $\Delta coq6/\Delta$ 16 (B) ont été cultivées en YNB-P 2% glucose contenant ou non les concentrations indiquées de pABA, 4-HB, VA ou 3O,4N-B. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

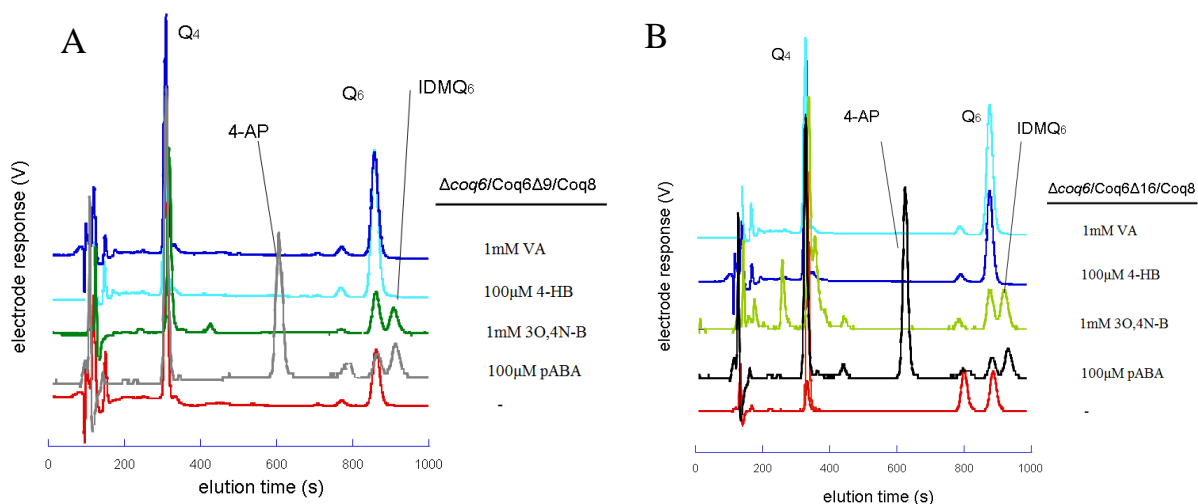


Figure 80: Absence d'effet de la surexpression de Coq8 dans $\Delta coq6/Coq6\Delta$ 9 et $\Delta coq6/Coq6\Delta$ 16. Les cellules $\Delta coq6/Coq6\Delta$ 9/Coq8 (A) et $\Delta coq6/Coq6\Delta$ 16/Coq8 (B) ont été cultivées en YNB-

P 2% glucose contenant ou non les concentrations indiquées de pABA, 4-HB, VA ou 3O,4N-B. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

L'ensemble de nos résultats montre la stabilité des formes tronquées de Coq6 et révèle l'importance de la partie C-terminale de Coq6 dans la réaction d'hydroxylation en C5 des intermédiaires aminés issus du pABA aussi bien que dans la réaction de déamination en C4.

De plus, la surexpression de Coq8 n'entraîne pas une diminution des intermédiaires aminés accumulés dans $\Delta coq6/Coq6\Delta 9$ et $\Delta coq6/Coq6\Delta 16$ suggérant ainsi que la stabilité de la déaminase est indépendante de la surexpression de Coq8 dans ces souches.

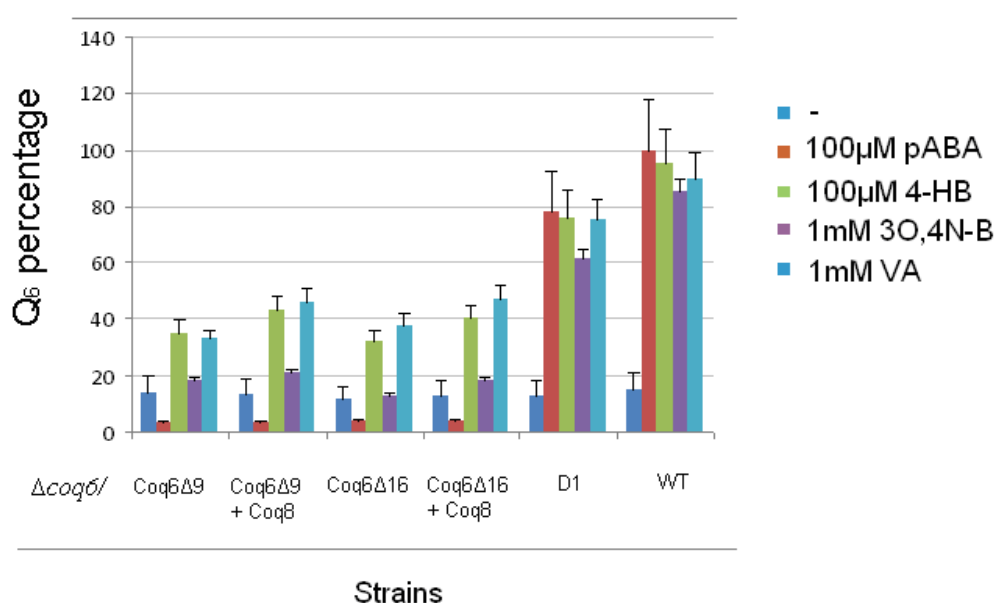


Figure 81: Quantification des contenus en coenzyme Q₆ des souches $\Delta coq6/Coq6\Delta 9$, $\Delta coq6/Coq6\Delta 16$, $\Delta coq6/D1$ et WT cultivées en présence des concentrations indiquées de pABA, 4-HB, 3O,4N-B et VA. Les barres d'erreur représentent l'écart type (n = 3)

IV. Surexpression de Coq6 dans le mutant $\Delta coq9/Coq8$

Tous nos résultats précédents montrent un défaut de déamination dans les mutants $\Delta coq6$ et $\Delta coq9$. De plus, le résultat de notre crible génétique suggère fortement l'implication de Coq6

dans l'étape de déamination. Nous étions donc intéressés de surexprimer Coq6 dans $\Delta coq9/Coq8$ afin de vérifier si cela pouvait favoriser la déamination dans ce mutant.

Comme le montre la figure 82, la surexpression de Coq6 dans le mutant $\Delta coq9/Coq8$ n'a pas d'effet. En effet, le mutant $\Delta coq9/Coq8/Coq6$ (figure 82A) accumule, comme le mutant $\Delta coq9/Coq8$ (figure 82B), de la DMQ₆ et de l'IDMQ₆ en présence du 3O,4N-B ou de l'AMB et uniquement de la DMQ₆ en présence de VA (figure 82). De plus, il est clair que l'IDMQ₆ et la DMQ₆ s'accumulent dans les mêmes proportions dans la souche $\Delta coq9/Coq8$ et $\Delta coq9/Coq8/Coq6$. Ainsi, la surexpression de Coq6 ne semble pas promouvoir la déamination dans $\Delta coq9/Coq8$.

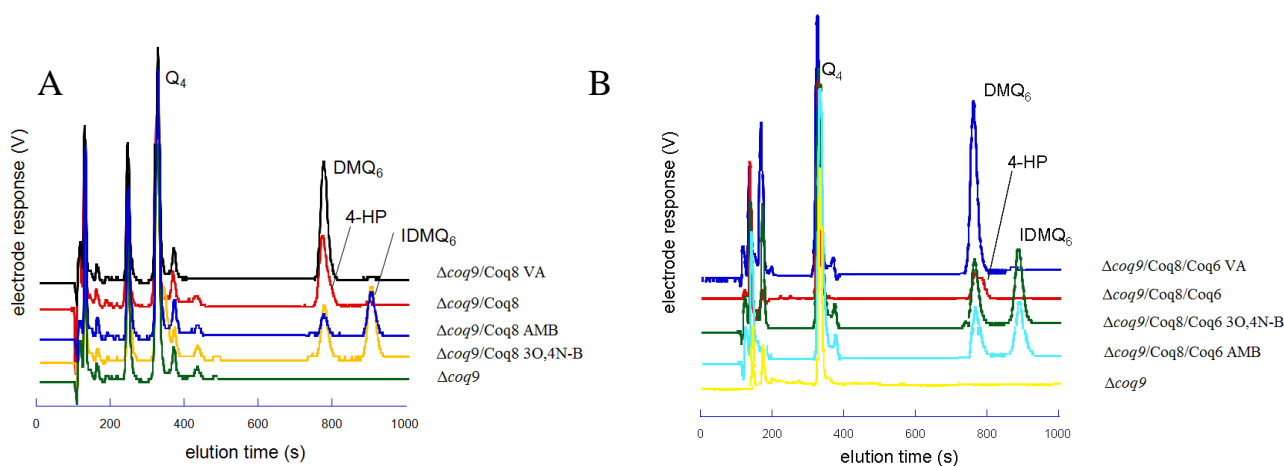


Figure 82: Absence d'effet de la surexpression de Coq6 dans le mutant $\Delta coq9/Coq8$. Le mutant $\Delta coq9$ et le mutant $\Delta coq9/Coq8$ surexprimant Coq6 ont été cultivés en YNB-P 2% glucose contenant ou non 1 mM 3O,4N-B ou VA ou 100 μ M pABA. Les extraits lipidiques de 6 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

Des résultats comparables ont été obtenus avec la surexpression de Coq6-G202V et des formes tronquées de Coq6 dans $\Delta coq9/Coq8$ (données non présentées).

Même si nos résultats semblent indiquer que la surexpression de Coq6 est sans effet, il sera donc important de tester les niveaux protéiques des différentes formes de Coq6 en absence de Coq9 afin de vérifier si la surexpression a été efficace et de pouvoir ainsi conclure sur ces résultats.

V. Surexpression des isoformes humaines de Coq6 dans le mutant $\Delta coq6$

Il a récemment été montré la complémentation du défaut de biosynthèse du coenzyme Q_6 d'une souche de levure $\Delta coq6$ par la surexpression de Coq6 humaine (Heeringa et al, 2011). En fait, le gène humain codant pour Coq6 contient 12 exons pouvant donner 18 isoformes avec des épissages alternatifs (Heeringa et al, 2011). Deux isoformes humaines de Coq6 (hCoq6iso1 et hCoq6iso2), ont été détectées dans des fibroblastes primaires avec abondance plus importante de hCoq6iso1 par rapport à hCoq6iso2. Deux plasmides contenant les gènes codants pour hCoq6iso1 et hCoq6iso2 nous ont été donnés par le Dr. Leonardo Salviati. hCoq6iso2 diffère de hCoq6iso1 par la nature de l'exon 1 et le manque de l'exon 3 (figure 83).

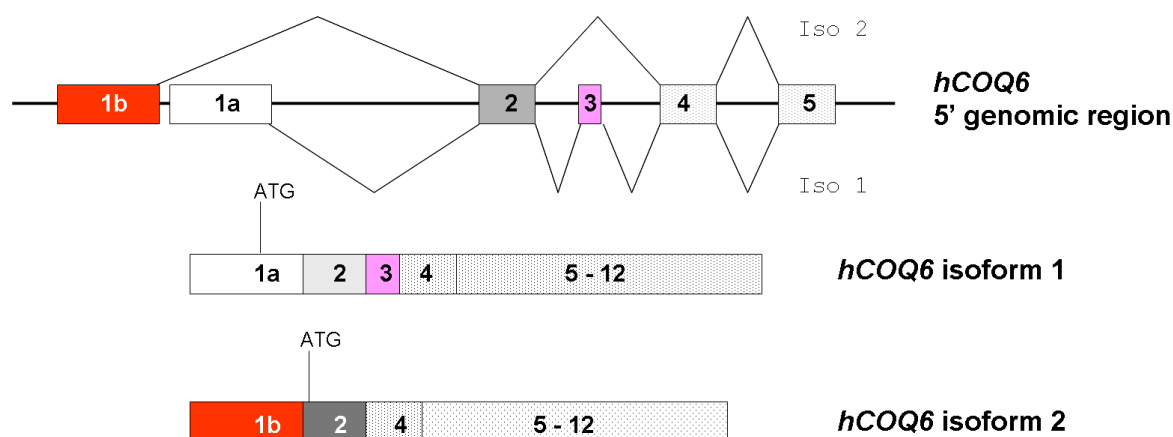


Figure 83: Structure de la région 5' génomique de COQ6 humain et des transcrits codant pour les deux isoformes hCoq6iso1 et hCoq6iso2 du gène. Les exons spécifiques des isoformes sont représentés en couleurs différentes. Le codon initiateur ATG est représenté sur les deux isoformes (Adapté de (Heeringa et al, 2011)).

Afin de tester la capacité déaminase des protéines humaines, nous avons surexprimé hCoq6iso1 et hCoq6iso2 dans le mutant $\Delta coq6$.

La surexpression de hCoq6iso1 rétablit la biosynthèse du coenzyme Q_6 dans le mutant $\Delta coq6$ en présence de 4-HB (endogène ou exogène) mais pas en présence du pABA qui conduit principalement à l'accumulation de 4-AP (figure 84A). Une très faible quantité de coenzyme Q_6 a été détectée en présence du 3O,4N-B.

Aucune complémentation de Coq6 n'a été observée en surexprimant hCoq6iso2 (figure 84B). Cependant, la souche $\Delta coq6$ transformée avec les deux isoformes humaines synthétise du coenzyme Q₆ à partir de VA montrant que ces protéines humaines ainsi que les autres protéines Coq impliquées dans la biosynthèse de Q₆ sont stables au moins en partie (figure 84).

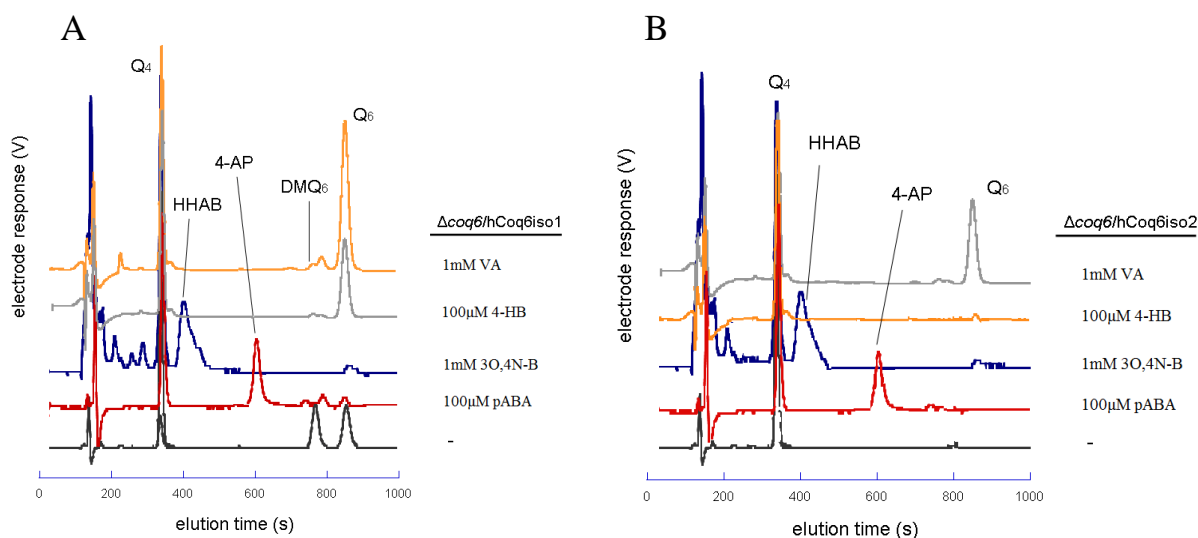


Figure 84: La surexpression de l'isoforme humaine 1 de Coq6 rétablit la biosynthèse du coenzyme Q₆ dans le mutant $\Delta coq6$. La souche $\Delta coq6$ transformée avec les isoformes humaines hcoq6iso1 (A) ou hcoq6iso2 (B) a été cultivée en YNP-P 2% glucose contenant ou non les concentrations indiquées de pABA, 4-HB, VA ou 3O,4N-B. Les extraits lipidiques de 4 mg de cellules ont été analysés par HPLC-ECD.

La très faible quantité de coenzyme Q₆ synthétisé à partir de 3O,4N-B dans $\Delta coq6/hCoq6iso1$ suggère fortement que la déamination n'a pas eu lieu dans cette souche. De plus, le fait que le 4-AP s'accumule en présence de pABA montre que hCoq6iso1 est incapable de catalyser l'hydroxylation en C5 sur un substrat aminé en C4 alors que cette réaction a lieu sur un substrat hydroxylé en C4 puisque nous observons une synthèse de Q₆ à partir de 4-HB. Ce cas de figure est semblable à celui rencontré lors de la surexpression de Coq6Δ9 et de Coq6Δ16 dans $\Delta coq6$ et est compatible avec un rôle très important de l'extrémité C-terminale de la protéine Coq6 de *S. cerevisiae* dans l'étape de déamination. Il est intéressant de souligner que cette partie de la séquence de Coq6 n'est pas conservée entre *S. cerevisiae* et *Homo sapiens* (figure 78).

VI. Modélisation de la structure de Coq6 de *S. cerevisiae*

En se basant sur la structure de MtmOiv, une mono-oxygénase impliquée dans la voie de biosynthèse de la mithramycine chez *Streptomyces Argillaceus* (Beam et al, 2009), notre collaborateur Marc Bergdoll (IBMP, strasbourg) a réussi à modéliser une structure de Coq6 de *S. cerevisiae* (figure 85). Comme le montre le modèle de la structure de Coq6, la partie C-terminale (représentée en rouge) ressemble à une pince qui entoure le site actif de la protéine contenant le FAD (représenté en bleu). Une vue plus proche du site actif de Coq6, a révélée la possibilité d'existence de deux sites d'interactions électrostatiques de la partie C-terminale avec les deux hélices entourants le FAD (K479/T391 et D472/K436) (figure 85B). Comme la mutation ponctuelle dans COQ6 (G386A-N388D) inactive complètement la protéine (Ozeir et al, 2011), il est possible d'envisager que la délétion de la partie C-terminale de Coq6 qui élimine la lysine 479 affecte le positionnement de la thréonine 391 (proche de G386 et N388) ce qui pourrait désorganiser le site actif et donc affecter le bon fonctionnement de Coq6. Il sera donc intéressant de muter ces résidus afin de vérifier si les protéines modifiées se comportent comme les formes tronquées de Coq6 et donc de prouver l'importance du domaine C-terminale de Coq6 de *S. cerevisiae* dans l'hydroxylation en C5 de HAB aussi bien que dans la déamination en C4.

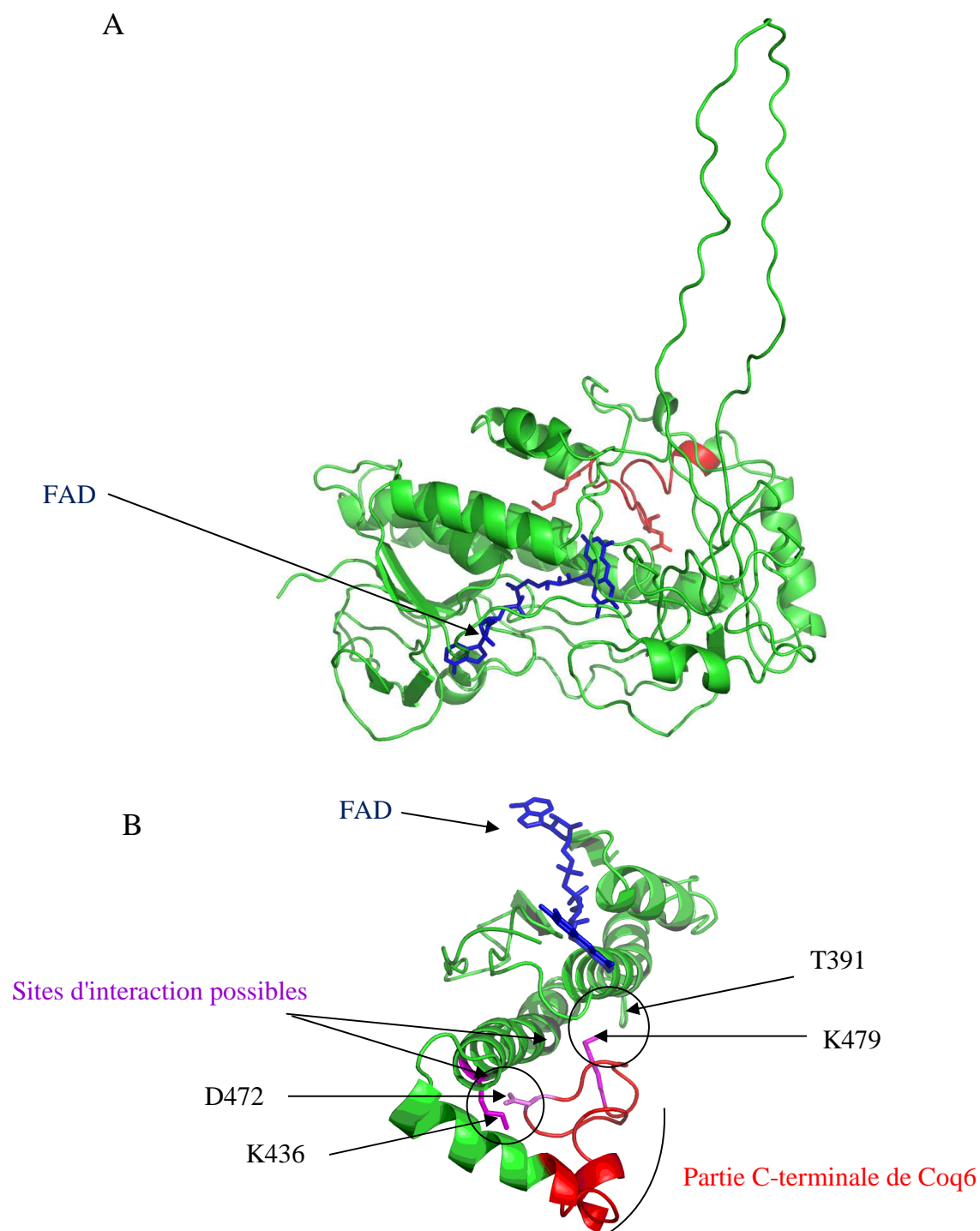


Figure 85: modélisation de la structure entière (A) ou partielle (B) de Coq6 de *S. cerevisiae*. Les 20 derniers acides aminés de la partie C-terminale sont représentés en rouge. Le FAD est représenté en bleu et la coloration violette indique les sites d'interaction possibles de la partie C-terminale avec les hélices entourant le site actif de Coq6 (K479/T391 et D472/K436).

Discussion

Des études récentes en 2010 ont permis de mettre en évidence l'implication du pABA dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ en tant que précurseur du noyau benzénique (Marbois et al, 2010; Pierrel et al, 2010). Pourtant, le coenzyme Q₆ ne comporte pas de groupement amine montrant ainsi l'existence d'une nouvelle étape de déamination en C4 essentielle à la biosynthèse du coenzyme Q₆ à partir de pABA. Parmi les différents modèles utilisés pour étudier la biosynthèse du coenzyme Q (*E. coli*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*) (Meganathan, 2001), on retrouve spécifiquement le pABA en tant que précurseur de coenzyme Q₆ chez *S. cerevisiae*. Ceci suggère donc que l'étape de déamination n'est pas conservée entre les espèces et que donc la déaminase impliquée est exclusivement présente chez *S. cerevisiae*.

Notre précédente étude sur Coq8 combinée à la présente étude révèlent de nouveaux éléments concernant cette réaction de déamination en C4:

La réaction de déamination nécessite un mécanisme enzymatique et ne peut pas se faire par les réactions d'hydrolyses non enzymatiques. En effet, si une simple hydrolyse était impliquée, alors l'IDMQ₆ devrait être converti en DMQ₆ car il a été proposé comme étant le précurseur de ce dernier (Marbois et al, 2010).

Les mutants $\Delta coq6$ et $\Delta coq9$ surexprimant Coq8 accumulent des composés aminés (4-AP et IDMQ₆) en présence du pABA, mais également des composés hydroxylés en présence de 4-HB (4-HP et DMQ₆). Ceci suggère que les produits de prénylation du pABA et du 4-HB, le HAB et le HHB respectivement, subissent le même enchainement de modification du noyau benzénique pour aboutir à la synthèse de DMQ₆/IDMQ₆. Ainsi, contrairement à Coq7, les protéines Coq3, Coq5, la décarboxylase C1 et l'hydroxylase C1 reconnaissent et catalysent leurs réactions sur les composés aminés en C4 aussi bien que sur les composés hydroxylés en C4. Dans le cas de Coq7, la synthèse de coenzyme Q₆ dans $\Delta coq6$ /Coq8 en présence de VA et l'accumulation de l'IDMQ₆ en présence du 3O,4N-B montre une déficience d'hydroxylation en C6 pour l'IDMQ₆. En fait, ce dernier résultat n'est pas exclusif pour Coq7 de *S. cerevisiae* car des données non encore publiées obtenues dans notre équipe montrent que Clk1, l'équivalent humain de Coq7, elle aussi, n'hydroxyle pas l'IDMQ₆.

Dans $\Delta coq5/Coq8$, la déamination a lieu avant la méthylation en C2 catalysée par Coq5. Cela est évident par l'accumulation de la DDMQ₆ mais pas de l'IDDMQ₆ en présence du pABA. Par contre, la question posée maintenant c'est de savoir à quelle étape se fait la déamination dans une souche WT. En effet, elle pourrait avoir lieu avant la méthylation en C2 catalysée par Coq5 ou avant l'hydroxylation en C6 catalysée par Coq7, tel que suggéré par les résultats établissant que l'IDMQ₆ est le précurseur de la DMQ₆ (Marbois et al, 2010). En fait, les auteurs ont montré l'accumulation de quantités minimales de l'IDMQ₆, (0,028 pmol/DO) en comparant avec l'accumulation de la DMQ₆, (0,4 pmol/DO) dans le mutant ponctuel *coq7-1* aussi bien que dans une souche WT, cultivées en présence du pABA (Marbois et al, 2010). Ceci est en accord avec nos résultats montrant l'accumulation de la DMQ₆ plutôt que de l'IDMQ₆ dans $\Delta coq7/Coq8$ (figure 69). L'IDMQ₆ accumulé dans la souche WT a été détecté par HPLC-MS par nos collaborateurs américains alors que nos expériences utilisant la détection ECD ne permettent pas de mettre en évidence une si faible quantité d'IDMQ₆.

Quelle est donc la cause de l'accumulation d'une faible quantité d'IDMQ₆ dans une souche WT? Est-ce un intermédiaire physiologique qui s'accumule en faible quantité à cause de sa conversion efficace en DMQ₆? ou est-ce un sous-produit formé lorsque la réaction de déamination, qui pourrait se produire avant Coq5, est défailante? Des expériences complémentaires devront répondre à cette question.

La réaction de déamination est catalysée efficacement chez les mutants $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$ alors qu'elle ne se fait pas dans les mutants $\Delta coq6$ et $\Delta coq9$ montrant ainsi qu'elle est dépendante de la présence de Coq6 et Coq9. Cependant, il semble que la déamination ne soit pas affectée par la présence de groupement hydroxyle ou méthoxyle en C5 d'après l'augmentation de la synthèse de la DDMQ₆ et de la DMQ₆ dans $\Delta coq5/Coq8$ et $\Delta coq7/Coq8$ ainsi que de celle du coenzyme Q₆ dans le WT en présence du 3O,4-NB ou de l'AMB (figure 66 et 69). Ces résultats établissent que la déamination peut avoir lieu si l'hydroxyle en C5 résulte de l'utilisation d'un analogue hydroxylé du pABA et non de la réaction catalysée par Coq6. Ainsi, la déamination en C4 n'a pas obligatoirement lieu en même temps que l'hydroxylation en C5.

Cependant, tous nos résultats précédents montrent la concomitance du défaut de déamination en C4 avec le défaut d'hydroxylation en C5 mise à part le cas de l'IDMQ₆ qui sera abordé plus loin. En effet, l'accumulation d'intermédiaires aminés (4-AP, IDMQ₆) est exclusive

pour les mutants présentant un défaut d'hydroxylation en C5 ($\Delta coq3/Coq8$, $\Delta coq6/Coq8$, $\Delta coq6/Coq6\text{-G202V}$ et $\Delta coq9/Coq8$). De plus, la déplétion de Yah1, qui entraîne un défaut d'hydroxylation en C5 (en inhibant l'activité de Coq6), affecte aussi la déamination en C4. Ceci est donc en accord avec un rôle de Coq6 dans l'étape de déamination en C4.

Les résultats de notre crible génétique suggèrent fortement l'implication de Coq6 ou au moins de sa partie C-terminale dans cette étape de déamination. En effet, nous avons réussi à isoler des clones qui poussent sur milieu respiratoire contenant du 3O,4N-B mais pas du pABA et le séquençage des plasmides provenant de la banque a révélé l'existence de formes tronquées de Coq6. Pourtant, nous nous demandons si la capacité des souches $\Delta coq6/Coq6\Delta 9$ et $\Delta coq6/Coq6\Delta 16$ à pousser sur milieu respiratoire contenant du 3O,4N-B mais pas du pABA est due à une biosynthèse de Q_6 à partir de 3O,4N-B ou bien au fait que le 3O,4N-B n'est pas un compétiteur du 4-HB endogène au niveau de Coq2 aussi efficace que le pABA. Ces formes tronquées sont capables de catalyser efficacement l'hydroxylation en C5 en présence de 4-HB mais pas en présence de pABA. En effet, $\Delta coq6/Coq6\Delta 9$ et $\Delta coq6/Coq6\Delta 16$ synthétisent du coenzyme Q_6 à partir de 4-HB et accumulent du 4-AP en présence de pABA (figure 79). Ainsi, ces formes tronquées de Coq6 sont inefficaces pour catalyser l'hydroxylation en C5 sur des composés aminés (HAB). A l'appui de cela, la surexpression de l'isoforme humaine 1 de Coq6 (hCoq6iso1), dont la partie C-terminale est différente de celle de Coq6 de *S. cerevisiae*, montre un effet similaire aux formes tronquées de Coq6. L'absence d'hydroxylation du HAB dans $\Delta coq6/Coq6\Delta 9$, $\Delta coq6/Coq6\Delta 16$ et $\Delta coq6/hCoq6iso1$ suggère ainsi que la déamination est préférentiellement réalisée avant, ou en parallèle, à la réaction d'hydroxylation en C5 même si elle peut se faire sur des composés ayant un hydroxyle en C5 comme le HHAB.

Juste avant la fin de la rédaction, notre collaborateur Marc Bergdoll a réussi à modéliser une structure de Coq6 (figure 85). Ainsi, il semble que deux résidus (K479 et D472) de la partie C-terminale de Coq6 interagissent par des liaisons électrostatiques avec les deux hélices entourants le site actif liant le FAD. Nous pensons donc que l'absence de la partie C-terminale de Coq6 pourrait affecter la position des deux hélices qui structurent le site actif. Cette modification de conformation pourrait empêcher la liaison du HAB mais pas du HHB et ainsi expliquer l'hydroxylation en C5 sélectivement des composés hydroxylés en C4 que nous avons observé.

Alternativement, le HAB pourrait toujours se lier, mais d'une façon non appropriée, au site actif de Coq6 tronquées ce qui perturbe ainsi la déamination et l'hydroxylation de ce composé.

Tous nos résultats supportent donc l'hypothèse que Coq6 est la déaminase impliquée dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ à l'exception de l'accumulation de l'IDMQ₆ dans le mutant $\Delta coq9/Coq8$ ou même dans une souche WT cultivée en présence du pABA. En effet, l'accumulation de l'IDMQ₆ montre clairement que l'hydroxylation en C5 a été catalysée alors que la déamination en C4 est déficiente. A moins d'imaginer que l'hydroxylation en C5 pourrait-être réalisée par une autre protéine que Coq6 spécifiquement dans la souche $\Delta coq9/Coq8$, l'accumulation de l'IDMQ₆ suggère donc l'implication d'une autre protéine que Coq6 dans l'étape de déamination en C4. Il sera cependant important de s'assurer que Coq6 est bien détectable dans $\Delta coq9/Coq8$.

En tout les cas, il semble que la partie C-terminale de Coq6 est importante pour l'activité déaminase et donc l'absence de cette partie affecte soit l'activité déaminase de Coq6, soit la stabilité d'une déaminase associée à Coq6. Les résidus D472 et K479 appartiennent à la partie C-terminale de Coq6 et semblent interagir avec des éléments de structure déterminant pour l'environnement du site actif de Coq6. La mutation des résidus D472 et K479 pourrait nous éclaircir sur l'implication de la partie C-terminale de Coq6 dans l'activité déaminase ou dans la stabilisation d'une potentielle déaminase. En effet, l'obtention d'une forme modifiée de Coq6 qui se comporterait comme les formes tronquées suggérerait fortement une activité déaminase en C4 en plus de l'activité C5 hydroxylase pour Coq6 car il nous semble peu probable que la mutation d'un seul acide aminé dans Coq6 affecte la stabilité d'une autre protéine déaminase associée à Coq6. Un test d'activité *in vitro* de Coq6 sera prochainement mis en place afin de tester sa capacité déaminase/hydroxylase en C4 sur des analogues farnésylés du HAB.

Par ailleurs, les études menées dans ce chapitre ont été rendues difficiles par le fait que le 4-HB endogène contribue significativement à la quantité du coenzyme Q₆ biosynthétisé dans les mutants étudiés et que ce 4-HB endogène est un compétiteur efficace du 3O,4N-B ou de l'AMB pour entrer dans la voie de biosynthèse de Q₆.

Une partie de ces difficultés pourrait être prochainement résolue car notre équipe a réussi à isoler un mutant déficient pour la biosynthèse du 4-HB. Lorsque l'identité de ce gène sera connue, il sera intéressant de combiner cette mutation dans les mutants $\Delta coq6/Coq6\Delta 9$ et $\Delta coq6/Coq6\Delta 16$

afin de déterminer si ces mutants sont réellement capable de synthétiser de Q₆ à partir de 3O,4N-B.

Ainsi, après avoir résolu l'ambiguïté sur l'étape d'hydroxylation qui est dépendante de Coq6 (Chapitre I), une nouvelle ambiguïté apparaît et concerne l'implication de Coq6 dans l'étape de déamination en C4. Coq6 est-elle réellement la déaminase ou est-ce sa partie C-terminale qui est cruciale pour l'association et la stabilité d'une autre déaminase?

En résumé, cette étude nous a permis de montrer que:

- Des analogues hydroxylés ou méthoxylés du pABA (3O,4N-B et AMB) peuvent-être aussi des précurseurs du coenzyme Q₆ (figure III).
- La réaction de déamination en C4 est catalysée principalement avant ou en parallèle à la réaction d'hydroxylation en C5 même si elle peut vraisemblablement se dérouler sur des composés hydroxylés en C5 comme le HHAB.
- L'absence de la partie C-terminale de Coq6 affecte l'hydroxylation des composés aminés en C5 ainsi que la déamination en C4 révélant donc l'importance de Coq6 pour la réaction de déamination de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆.

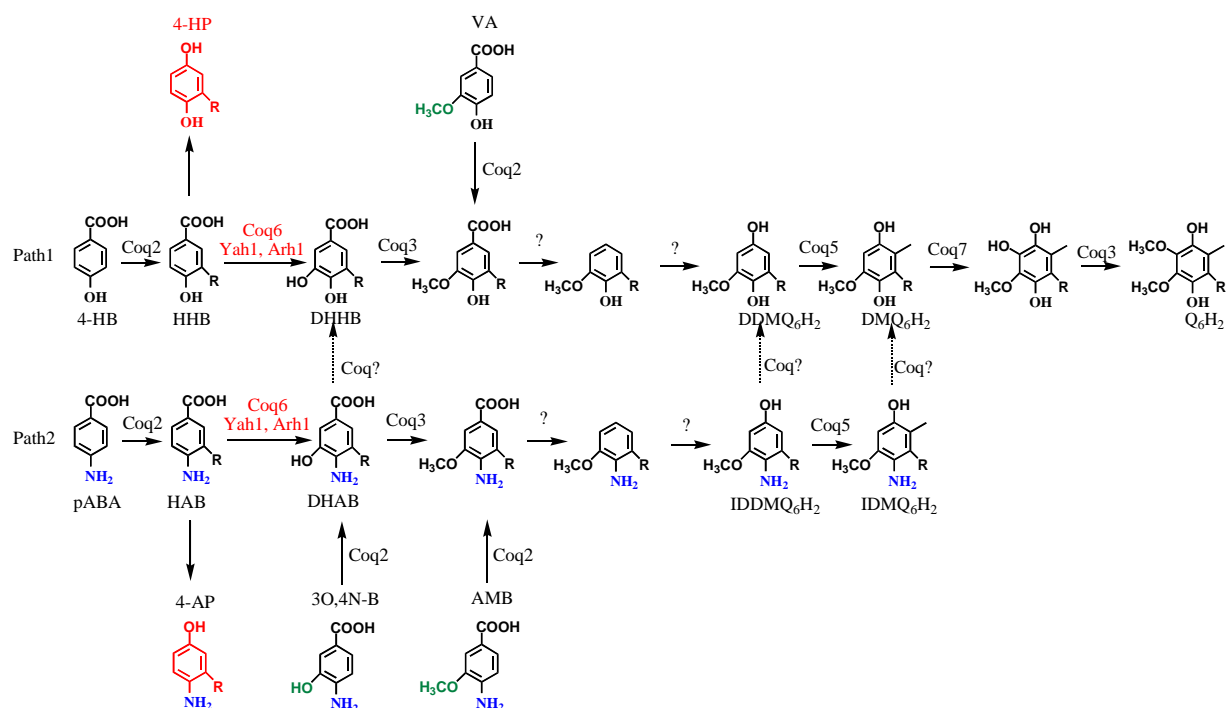


Figure III: Schéma de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ montrant l'utilisation des analogues de pABA. Les structures représentées en rouge correspondent aux intermédiaires accumulés dans les souches déficientes pour l'hydroxylation en C5. Les flèches en pointillées (allant du Path 2 à Path1) représentent les étapes de déamination possibles. 4-HP: acide 3-hexaprényl-4-hydroxyphénol; 4-AP: acide 3-hexaprényl-4-aminophénol; HAB: acide 3-hexaprényl-4-aminobenzoïque; HHB: acide 3-hexaprényl-4-hydroxybenzoïque; DHHB: acide 3-hexaprényl-4,5-dihydroxybenzoïque; HHAB: acide 3-hexaprényl-4-amino-5-hydroxybenzoïque; DDMQ₆H₂: déméthyl-déméthoxyubiquinol; IDDMQ₆H₂: iminodéméthyl-déméthoxyubiquinol; DMQ₆H₂: déméthoxyubiquinol; IDMQ₆: iminodéméthoxyubiquinol; Q₆H₂: ubiquinol; R: chaîne polysioprényle.

Conclusion générale

Nos connaissances actuelles sur la biosynthèse du coenzyme Q chez les microorganismes proviennent principalement des études faites par la Prof. Catherine Clarke et ses collaborateurs. Pendant plusieurs années, Clarke a montré la participation de neuf protéines (Coq1-Coq9) dont la plupart sont organisées au sein d'un complexe multiprotéique, dans cette voie de biosynthèse. Cependant, les fonctions des protéines Coq4, Coq6, Coq8 et Coq9 n'ont pu être caractérisées jusqu'à présent principalement à cause de l'instabilité des protéines Coq dans les mutants Δcoq qui conduit à l'absence d'intermédiaires de biosynthèse. En 2010, Fabien a été le premier à démontrer le rôle du pABA en tant que précurseur du noyau benzénique du coenzyme Q₆ ainsi que celui de la ferrédoxine mitochondriale Yah1 dans la réaction d'hydroxylation en C5. Par conséquent, de nouvelles questions sont apparues concernant l'implication de Yah1 dans la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ ainsi que sur l'étape de déamination en C4, absolument nécessaire pour la biosynthèse de Q₆ en présence de pABA.

Notre but a donc été de mieux comprendre l'implication des protéines Coq6, Coq8 et Coq9 dans la biosynthèse du coenzyme Q₆, de préciser le rôle de Yah1 dans l'hydroxylation en C5 et à terme d'identifier la déaminase essentielle à la biosynthèse du coenzyme Q₆.

Durant ce travail nous avons donc levé l'ambiguïté entourant le rôle de Coq6 et nous avons clairement montré que l'hydroxylase Coq6 était uniquement impliquée dans la réaction d'hydroxylation en C5. En conséquence, la protéine qui catalyse l'hydroxylase en C1 reste non identifiée. Nous suggérons néanmoins que cette hydroxylase en C1 n'est pas une des protéines Coq (Coq1-Coq10) identifiée jusqu'à présent et qu'elle n'emploie probablement pas de cofacteur flavinique à la différence de Coq6.

Le rôle de Yah1 dans l'hydroxylation en C5 n'est toujours pas clair. Cependant, nous avons montré au cours de ce travail que l'absence de Yah1 n'affecte ni la stabilité de Coq6 ni le contenu mitochondrial en FAD nécessaire à son activité catalytique. Ainsi, grâce à ces données, nous avons émis l'hypothèse d'un mécanisme inhabituel dans lequel la réduction de la flavine de Coq6 pourrait dépendre du système Yah1/Arh1. Le test d'activité *in vitro* de Coq6 purifiée permettra d'apporter des réponses claires sur ce point.

Après l'étude sur Coq6, nous nous sommes focalisés sur l'étude de Coq8 et nous avons montré que la surexpression de Coq8 entraînait la stabilisation de la plupart des protéines Coq dans les mutants Δcoq . Nous avons mis en évidence que l'activité kinase de Coq8 était à la base de son rôle stabilisateur du complexe multiprotéique nécessaire à la biosynthèse de Q₆. Cette stabilisation des protéines Coq a pour conséquence d'entraîner l'accumulation d'intermédiaires diagnostiques de l'étape déficiente de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ dans les mutants Δcoq . Cette avancée majeure a permis de mieux caractériser l'implication de plusieurs protéines, notamment Coq4 et Coq9. Tout d'abord, les intermédiaires accumulés par les mutants $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$ surexprimant Coq8 sont en accord avec l'implication démontrée de Coq5 dans la réaction de méthylation en C2 et de Coq7 dans l'étape d'hydroxylation en C6. Ensuite, les intermédiaires accumulés dans $\Delta coq9/Coq8$ nous ont permis de montrer l'importance de Coq9 pour les deux réactions d'hydroxylation en C5 et C6. Il semble que Coq9 soit importante pour la stabilité de Coq6 et de Coq7. Nous envisageons donc de réaliser des études biochimiques et génétiques pour mieux comprendre le rôle exact de Coq9.

De plus, nos données supportent un rôle structural plutôt que catalytique pour la protéine Coq4 car la séquence de cette dernière ne contient pas une séquence consensus d'un domaine catalytique et que l'absence de Coq4 altère au moins deux étapes dans la voie de biosynthèse de Q.

Durant les études de Coq6 et de Coq8, nous avons aussi utilisé la stratégie de compléter le milieu de culture des levures avec des analogues de précurseurs pour éclaircir le rôle de certaines protéines Coq. En effet, nous avons montré, pour la première fois dans la voie de biosynthèse de Q₆, l'intérêt d'utiliser le 3,4-diHB ou le VA pour court-circuiter une déficience pour l'hydroxylation en C5 et le 2,4-diHB pour court-circuiter une déficience d'hydroxylation en C6. De plus, nous avons montré que des analogues de pABA (3O,4N-B et AMB) peuvent être aussi des précurseurs du coenzyme Q₆. En outre, la présence d'un groupement hydroxyle ou méthoxyle en C5 n'affecte pas la réaction de déamination qui se déroule efficacement dans les mutants $\Delta coq5$ et $\Delta coq7$ mais pas dans $\Delta coq6$ et $\Delta coq9$.

A la fin de l'étude de Coq8 et selon les intermédiaires accumulés, nous avons classé les mutants en deux groupes: les mutants qui déaminent ($\Delta coq5$ et $\Delta coq7$) et ceux qui ne déaminent pas ($\Delta coq6$ et $\Delta coq9$). Nous avons remarqué la concomitance du défaut d'hydroxylation en C5 avec le défaut de déamination en C4 ce qui nous a suggéré que Coq6 pouvait jouer un rôle dans cette réaction de déamination.

Nous nous sommes ensuite servis de la génétique pour tenter d'identifier cette désaminase. Notre crible génétique a identifié deux formes tronquées de Coq6 (Coq6 Δ 9 et Coq6 Δ 16) qui présentent un défaut de déamination ainsi qu'un défaut d'hydroxylation en C5 du HAB mais pas du HHB. Un résultat similaire a été obtenu par la surexpression de l'isoforme humaine 1 de Coq6 (hCoq6iso1), dont la partie C-terminale est différente de la partie C-terminale de Coq6 de *S. cerevisiae*. En effet, la surexpression de hCoq6iso1 complémente le défaut d'hydroxylation en C5 du mutant $\Delta coq6$ cultivé en présence de 4-HB mais pas en présence de pABA. Ainsi, plusieurs résultats montrent que les neuf acides aminés de la partie C-terminale de Coq6 sont importants pour la réaction de déamination en C4. L'absence de ces acides aminés pourrait donc affecter soit le bon repliement de Coq6 soit la stabilité d'une autre protéine qui catalyse la déamination. Ainsi, on ne sait toujours pas si Coq6 est la déaminase ou sa présence est cruciale pour la stabilité d'une autre déaminase. Un test d'activité *in vitro* sera absolument nécessaire pour prouver une éventuelle activité déaminase de Coq6.

L'ensemble de ce travail de thèse a donc permis d'avancer significativement dans la compréhension de la voie de biosynthèse du coenzyme Q₆ et a fait l'objet de deux publications parues dans 'Chemistry and Biology' et une dans 'The Journal of Biological Chemistry'.

Références bibliographiques

A

Adachi A, Shinjyo N, Fujita D, Miyoshi H, Amino H, Watanabe Y, Kita K (2003) Complementation of *Escherichia coli* ubiF mutation by *Caenorhabditis elegans* CLK-1, a product of the longevity gene of the nematode worm. *FEBS Lett* **543**(1-3): 174-178

Alam SS, Nambudiri AM, Rudney H (1975) 4-Hydroxybenzoate: polyprenyl transferase and the prenylation of 4-aminobenzoate in mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys* **171**(1): 183-190

Alexander K, Young IG (1978) Alternative hydroxylases for the aerobic and anaerobic biosynthesis of ubiquinone in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **17**(22): 4750-4755

Ashby MN, Kutsunai SY, Ackerman S, Tzagoloff A, Edwards PA (1992) *COQ2* is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J Biol Chem* **267**(6): 4128-4136

Aure K, Benoist JF, Ogier de Baulny H, Romero NB, Rigal O, Lombes A (2004) Progression despite replacement of a myopathic form of coenzyme Q10 defect. *Neurology* **63**(4): 727-729

Avelange-Macherel MH, Joyard J (1998) Cloning and functional expression of AtCOQ3, the Arabidopsis homologue of the yeast COQ3 gene, encoding a methyltransferase from plant mitochondria involved in ubiquinone biosynthesis. *Plant J* **14**(2): 203-213

B

Baba SW, Belogradov GI, Lee JC, Lee PT, Strahan J, Shepherd JN, Clarke CF (2004) Yeast Coq5 C-methyltransferase is required for stability of other polypeptides involved in coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem* **279**(11): 10052-10059

Bafunno V, Giancaspero TA, Brizio C, Bufano D, Passarella S, Boles E, Barile M (2004) Riboflavin uptake and FAD synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: involvement of the Flx1p carrier in FAD export. *J Biol Chem* **279**(1): 95-102

Ballou DP, Entsch B, Cole LJ (2005) Dynamics involved in catalysis by single-component and two-component flavin-dependent aromatic hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**(1): 590-598

Barkovich RJ, Shtanko A, Shepherd JA, Lee PT, Myles DC, Tzagoloff A, Clarke CF (1997) Characterization of the *COQ5* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a C-methyltransferase in ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* **272**(14): 9182-9188

Barros MH, Johnson A, Gin P, Marbois BN, Clarke CF, Tzagoloff A (2005) The *Saccharomyces cerevisiae* COQ10 gene encodes a START domain protein required for function of coenzyme Q in respiration. *J Biol Chem* **280**(52): 42627-42635

Barros MH, Nobrega FG (1999) YAH1 of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to human adrenodoxin. *Gene* **233**(1-2): 197-203

Barros MH, Nobrega FG, Tzagoloff A (2002) Mitochondrial ferredoxin is required for heme A synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**(12): 9997-10002

Beam MP, Bosserman MA, Noinaj N, Wehenkel M, Rohr J (2009) Crystal structure of Baeyer-Villiger monooxygenase MtmOIV, the key enzyme of the mithramycin biosynthetic pathway. *Biochemistry* **48**(21): 4476-4487

Behan RK, Lippard SJ (2010) The aging-associated enzyme CLK-1 is a member of the carboxylate-bridged diiron family of proteins. *Biochemistry* **49**(45): 9679-9681

Belogradov GI, Lee PT, Jonassen T, Hsu AY, Gin P, Clarke CF (2001) Yeast *COQ4* encodes a mitochondrial protein required for coenzyme Q synthesis. *Arch Biochem Biophys* **392**(1): 48-58

Bentinger M, Brismar K, Dallner G (2007) The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion* **7**: S41-S50

Bentley R (1990) The shikimate pathway--a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **25**(5): 307-384

Bhagavan HN, Chopra RK (2005) Potential role of ubiquinone (coenzyme Q10) in pediatric cardiomyopathy. *Clin Nutr* **24**(3): 331-338

Bousquet I, Dujardin G, Slonimski PP (1991) *ABC1*, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria: it suppresses a cytochrome *b* messenger-RNA translation defect and is essential for the electron-transfer in the *bc1* complex. *EMBO J* **10**(8): 2023-2031

Bouvier F, d'Harlingue A, Hugueney P, Marin E, Marion-Poll A, Camara B (1996) Xanthophyll biosynthesis - Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of beta-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*). *J Biol Chem* **271**(46): 28861-28867

Brea-Calvo G, Rodriguez-Hernandez A, Fernandez-Ayala DJ, Navas P, Sanchez-Alcazar JA (2006) Chemotherapy induces an increase in coenzyme Q10 levels in cancer cell lines. *Free Radic Biol Med* **40**(8): 1293-1302

C

Clarke CF, Williams W, Teruya JH (1991) Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and sequence of COQ3, the 3,4-dihydroxy-5-hexaprenylbenzoate methyltransferase gene. *J Biol Chem* **266**(25): 16636-16644

Collins MD, Jones D (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol Rev* **45**(2): 316-354

Crane FL (2007) Discovery of ubiquinone (coenzyme Q) and an overview of function. *Mitochondrion* **7 Suppl**: S2-7

D

Dibrov E, Robinson KM, Lemire BD (1997) The COQ5 gene encodes a yeast mitochondrial protein necessary for ubiquinone biosynthesis and the assembly of the respiratory chain. *J Biol Chem* **272**(14): 9175-9181

Diomedi-Camassei F, Di Giandomenico S, Santorelli FM, Caridi G, Piemonte F, Montini G, Ghiggeri GM, Murer L, Barisoni L, Pastore A, Muda AO, Valente ML, Bertini E, Emma F (2007) COQ2 nephropathy: a newly described inherited mitochondriopathy with primary renal involvement. *J Am Soc Nephrol* **18**(10): 2773-2780

Disch A, Rohmer M (1998) On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiol Lett* **168**(2): 201-208

Do TQ, Hsu AY, Jonassen T, Lee PT, Clarke CF (2001) A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae abc1* mutants. *J Biol Chem* **276**(21): 18161-18168

Duncan AJ, Bitner-Glindzicz M, Meunier B, Costello H, Hargreaves IP, Lopez LC, Hirano M, Quinzii CM, Sadowski MI, Hardy J, Singleton A, Clayton PT, Rahman S (2009) A Nonsense Mutation in COQ9 Causes Autosomal-Recessive Neonatal-Onset Primary Coenzyme Q(10) Deficiency: A Potentially Treatable Form of Mitochondrial Disease. *Am J Hum Genet* **84**(5): 558-566

E

Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K, Klingenberg M (2001) Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H⁺ transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1416-1421

Eggink G, Engel H, Vriend G, Terpstra P, Witholt B (1990) Rubredoxin reductase of pseudomonas-oleovorans-structural relationship to other flavoprotein oxidoreductase based on one NAD and 2 FAD fingerprint. *J Mol Biol* **212**(1): 135-142

Eppink MH, Schreuder HA, Van Berkel WJ (1997) Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with a putative dual function in FAD/NAD(P)H binding. *Protein Sci* **6**(11): 2454-2458

Ernster L, Dallner G (1995) Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* **1271**(1): 195-204

Ewbank JJ, Barnes TM, Lakowski B, Lussier M, Bussey H, Hekimi S (1997) Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* **275**(5302): 980-983

G

Gancedo JM (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(2): 334-361

Gin P, Clarke CF (2005) Genetic evidence for a multi-subunit complex in coenzyme Q biosynthesis in yeast and the role of the Coq1 hexaprenyl diphosphate synthase. *J Biol Chem* **280**(4): 2676-2681

Gin P, Hsu AY, Rothman SC, Jonassen T, Lee PT, Tzagoloff A, Clarke CF (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* *COQ6* gene encodes a mitochondrial flavin-dependent monooxygenase required for coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem* **278**(28): 25308-25316

Glerum DM, Tzagoloff A (1997) Submitochondrial distributions and stabilities of subunits 4, 5, and 6 of yeast cytochrome oxidase in assembly defective mutants. *FEBS Lett* **412**(3): 410-414

Gomez-Diaz C, Rodriguez-Aguilera JC, Barroso MP, Villalba JM, Navarro F, Crane FL, Navas P (1997) Antioxidant ascorbate is stabilized by NADH-coenzyme Q10 reductase in the plasma membrane. *J Bioenerg Biomembr* **29**(3): 251-257

H

Hamilton JA, Cox GB (1971) Ubiquinone biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. Accumulation of an octaprenol, farnesylfarnesylgeraniol, by a multiple aromatic auxotroph. *Biochem J* **123**(3): 435-443

Hamilton SJ, Chew GT, Watts GF (2007) Therapeutic regulation of endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* **4**(2): 89-102

Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V (1997) Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* **29**(1): 89-95

Heeringa SF, Chernin G, Chaki M, Zhou W, Sloan AJ, Ji Z, Xie LX, Salviati L, Hurd TW, Vega-Warner V, Killen PD, Raphael Y, Ashraf S, Ovunc B, Schoeb DS, McLaughlin HM, Airik R, Vlangos CN, Gbadegesin R, Hinkes B, Saisawat P, Trevisson E, Doimo M, Casarin A, Pertegato V, Giorgi G, Prokisch H, Rotig A, Nurnberg G, Becker C, Wang S, Ozaltin F, Topaloglu R, Bakkaloglu A, Bakkaloglu SA, Muller D, Beissert A, Mir S, Berdeli A, Varpizen S, Zenker M, Matejas V, Santos-Ocana C, Navas P, Kusakabe T, Kispert A, Akman S, Soliman NA, Krick S, Mundel P, Reiser J, Nurnberg P, Clarke CF, Wiggins RC, Faul C, Hildebrandt F (2011) COQ6

mutations in human patients produce nephrotic syndrome with sensorineural deafness. *J Clin Invest* **121**(5): 2013-2024

Hsieh EJ, Dinoso JB, Clarke CF (2004) A tRNA(Trp) gene mediates the suppression of cbs2-223 previously attributed to ABC1/COQ8. *Biochem Biophys Res Commun* **317**(2): 648-653

Hsieh EJ, Gin P, Gulmezian M, Tran UC, Saiki R, Marbois BN, Clarke CF (2007) *Saccharomyces cerevisiae* Coq9 polypeptide is a subunit of the mitochondrial coenzyme Q biosynthetic complex. *Arch Biochem Biophys* **463**(1): 19-26

Hsu AY, Do TQ, Lee PT, Clarke CF (2000) Genetic evidence for a multi-subunit complex in the O-methyltransferase steps of coenzyme Q biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1484**(2-3): 287-297

Hsu AY, Poon WW, Shepherd JA, Myles DC, Clarke CF (1996) Complementation of coq3 mutant yeast by mitochondrial targeting of the Escherichia coli UbiG polypeptide: evidence that UbiG catalyzes both O-methylation steps in ubiquinone biosynthesis. *Biochemistry* **35**(30): 9797-9806

J

Jiang N, Levavasseur F, McCright B, Shoubbridge EA, Hekimi S (2001) Mouse CLK-1 is imported into mitochondria by an unusual process that requires a leader sequence but no membrane potential. *J Biol Chem* **276**(31): 29218-29225

Johnson A, Gin P, Marbois BN, Hsieh EJ, Wu M, Barros MH, Clarke CF, Tzagoloff A (2005) *COQ9*, a new gene required for the biosynthesis of coenzyme Q in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**(36): 31397-31404

Jonassen T, Clarke CF (2000) Isolation and functional expression of human COQ3, a gene encoding a methyltransferase required for ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* **275**(17): 12381-12387

Jonassen T, Marbois BN, Kim L, Chin A, Xia YR, Lusis AJ, Clarke CF (1996) Isolation and sequencing of the rat Coq7 gene and the mapping of mouse Coq7 to chromosome 7. *Arch Biochem Biophys* **330**(2): 285-289

Jonassen T, Proft M, Randez-Gil F, Schultz JR, Marbois BN, Entian KD, Clarke CF (1998) Yeast Clk-1 homologue (Coq7/Cat5) is a mitochondrial protein in coenzyme Q synthesis. *J Biol Chem* **273**(6): 3351-3357

K

Kagan RM, Clarke S (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* **310**(2): 417-427

Kapust RB, Waugh DS (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**(8): 1668-1674

Katz JE, Dlakic M, Clarke S (2003) Automated identification of putative methyltransferases from genomic open reading frames. *Mol Cell Proteomics* **2**(8): 525-540

Kawamukai M (2002) Biosynthesis, bioproduction and novel roles of ubiquinone. *J Biosci Bioeng* **94**(6): 511-517

L

Lagier-Tourenne C, Tazir M, Lopez LC, Quinzii CM, Assoum M, Drouot N, Busso C, Makri S, Ali-Pacha L, Benhassine T, Anheim M, Lynch DR, Thibault C, Plewniak F, Bianchetti L, Tranchant C, Poch O, DiMauro S, Mandel JL, Barros MH, Hirano M, Koenig M (2008) ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q(10) deficiency. *Am J Hum Genet* **82**(3): 661-672

Lange H, Kaut A, Kispal G, Lill R (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(3): 1050-1055

Lee PT, Hsu AY, Ha HT, Clarke CF (1997) A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the Escherichia coli ubiE gene. *J Bacteriol* **179**(5): 1748-1754

Leonard CJ, Aravind L, Koonin EV (1998) Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the "eukaryotic" protein kinase superfamily. *Genome Res* **8**(10): 1038-1047

Li J, Saxena S, Pain D, Dancis A (2001) Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J Biol Chem* **276**(2): 1503-1509

Lill R (2009) Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* **460**(7257): 831-838

Longtine MS, McKenzie A, 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **14**(10): 953-961

Lopez LC, Schuelke M, Quinzii CM, Kanki T, Rodenburg RJ, Naini A, DiMauro S, Hirano M (2006) Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations. *Am J Hum Genet* **79**(6): 1125-1129

M

- Manzella L, Barros MH, Nobrega FG (1998) ARH1 of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to the human adrenodoxin reductase. *Yeast* **14**(9): 839-846
- Marbois B, Gin P, Faull KF, Poon WW, Lee PT, Strahan J, Shepherd JN, Clarke CF (2005) Coq3 and Coq4 define a polypeptide complex in yeast mitochondria for the biosynthesis of coenzyme Q. *J Biol Chem* **280**(21): 20231-20238
- Marbois B, Gin P, Gulmezian M, Clarke CF (2009) The yeast Coq4 polypeptide organizes a mitochondrial protein complex essential for coenzyme Q biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1791**(1): 69-75
- Marbois B, Xie LX, Choi S, Hirano K, Hyman K, Clarke CF (2010) para-aminobenzoic acid is a precursor in coenzyme Q(6) biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **285**(36): 27827-27838
- Marbois BN, Clarke CF (1996) The *COQ7* gene encodes a protein in *Saccharomyces cerevisiae* necessary for ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* **271**(6): 2995-3004
- Marbois BN, Hsu A, Pillai R, Colicelli J, Clarke CF (1994) Cloning of a rat cDNA encoding dihydroxypolyprenylbenzoate methyltransferase by functional complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in ubiquinone biosynthesis. *Gene* **138**(1-2): 213-217
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH (2005) CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue): D192-196
- Martin-Montalvo A, Gonzalez-Mariscal I, Padilla S, Ballesteros M, Brautigan DL, Navas P, Santos-Ocana C (2011) Respiratory-induced coenzyme Q biosynthesis is regulated by a phosphorylation cycle of Cat5p/Coq7p. *Biochem J* **440**(1): 107-114
- Meganathan R (2001) Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* **203**(2): 131-139
- Miller WL (2007) StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Mol Endocrinol* **21**(3): 589-601
- Mollet J, Delahodde A, Serre V, Chretien D, Schlemmer D, Lombes A, Boddaert N, Desguerre I, de Lonlay P, de Baulny HO, Munnich A, Rotig A (2008) CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures. *Am J Hum Genet* **82**(3): 623-630
- Mollet J, Giurgea I, Schlemmer D, Dallner G, Chretien D, Delahodde A, Bacq D, de Lonlay P, Munnich A, Rotig A (2007) Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate

polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *J Clin Invest* **117**(3): 765-772

Momose K, Rudney H (1972) 3-Polyprenyl-4-hydroxybenzoate synthesis in the inner membrane of mitochondria from p-hydroxybenzoate and isopentenylpyrophosphate. A demonstration of isoprenoid synthesis in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **247**(12): 3930-3940

Mukai K, Kikuchi S, Urano S (1990) Stopped-flow kinetic study of the regeneration reaction of tocopheroxyl radical by reduced ubiquinone-10 in solution. *Biochim Biophys Acta* **1035**(1): 77-82

Munro AW, Girvan HM, McLean KJ (2007) Cytochrome P450--redox partner fusion enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1770**(3): 345-359

N

Nambudiri AMD, Brockman D, Alam SS, Rudney H (1977) Alternate routes for ubiquinone biosynthesis in rats. *Biochem Biophys Res Commun* **76**(2): 282-288

Niewmierzyczna A, Clarke S (1999) S-Adenosylmethionine-dependent methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of a novel protein arginine methyltransferase. *J Biol Chem* **274**(2): 814-824

Nowicka B, Kruk J (2010) Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones. *Biochim Biophys Acta* **1797**(9): 1587-1605

O

Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D (1989) Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(7): 2379-2382

Okada K, Kainou T, Matsuda H, Kawamukai M (1998) Biological significance of the side chain length of ubiquinone in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **431**(2): 241-244

Okada K, Ohara K, Yazaki K, Nozaki K, Uchida N, Kawamukai M, Nojiri H, Yamane H (2004) The AtPPT1 gene encoding 4-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase in ubiquinone biosynthesis is required for embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **55**(4): 567-577

Olson RE, Rudney H (1983) Biosynthesis of ubiquinone. *Vitam Horm* **40**: 1-43

Olson RE, Springer CM, Aiyar AS, Gold PH, Ramsey G, Dialameh GH, Bentley R (1963) Benzoate derivatives as intermediates in biosynthesis of coenzyme Q in rat. *J Biol Chem* **238**(9): 3146-3148

Outten CE, Culotta VC (2003) A novel NADH kinase is the mitochondrial source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **22**(9): 2015-2024

Ozeir M, Muhlenhoff U, Webert H, Lill R, Fontecave M, Pierrel F (2011) Coenzyme Q biosynthesis: Coq6 Is required for the C5-hydroxylation reaction and substrate analogs rescue Coq6 deficiency. *Chem Biol* **18**(9): 1134-1142

P

Padilla S, Jonassen T, Jimenez-Hidalgo MA, Fernandez-Ayala DJ, Lopez-Lluch G, Marbois B, Navas P, Clarke CF, Santos-Ocana C (2004) Demethoxy-Q, an intermediate of coenzyme Q biosynthesis, fails to support respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and lacks antioxidant activity. *J Biol Chem* **279**(25): 25995-26004

Padilla S, Tran UC, Jimenez-Hidalgo M, Lopez-Martin JM, Martin-Montalvo A, Clarke CF, Navas P, Santos-Ocana C (2009) Hydroxylation of demethoxy-Q6 constitutes a control point in yeast coenzyme Q6 biosynthesis. *Cell Mol Life Sci* **66**(1): 173-186

Pain J, Balamurali MM, Dancis A, Pain D (2010) Mitochondrial NADH Kinase, Pos5p, Is Required for Efficient Iron-Sulfur Cluster Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **285**(50): 39409-39424

Palfey BA, Entsch B, Ballou DP, Massey V (1994) Changes in the catalytic properties of p-hydroxybenzoate hydroxylase caused by the mutation Asn300Asp. *Biochemistry* **33**(6): 1545-1554

Papucci L, Schiavone N, Witort E, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, Formigli L, Zecchi-Orlandini S, Orlandini G, Carella G, Brancato R, Capaccioli S (2003) Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem* **278**(30): 28220-28228

Peng M, Falk MJ, Haase VH, King R, Polyak E, Selak M, Yudkoff M, Hancock WW, Meade R, Saiki R, Lunceford AL, Clarke CF, Gasser DL (2008) Primary coenzyme Q deficiency in Pdss2 mutant mice causes isolated renal disease. *PLoS Genet* **4**(4): e1000061

Pierrel F, Bestwick ML, Cobine PA, Khalimonchuk O, Cricco JA, Winge DR (2007) Coa1 links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *EMBO J* **26**(20): 4335-4346

Pierrel F, Hamelin O, Douki T, Kieffer-Jaquinod S, Muhlenhoff U, Ozeir M, Lill R, Fontecave M (2010) Involvement of mitochondrial ferredoxin and para-aminobenzoic acid in yeast coenzyme Q biosynthesis. *Chem Biol* **17**(5): 449-459

Poon WW, Barkovich RJ, Hsu AY, Frankel A, Lee PT, Shepherd JN, Myles DC, Clarke CF (1999) Yeast and rat Coq3 and Escherichia coli UbiG polypeptides catalyze both O-methyltransferase steps in coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem* **274**(31): 21665-21672

Poon WW, Do TQ, Marbois BN, Clarke CF (1997) Sensitivity to treatment with polyunsaturated fatty acids is a general characteristic of the ubiquinone-deficient yeast coq mutants. *Molecular Aspects of Medicine* **18**: S121-S127

Poon WW, Marbois BN, Faull KF, Clarke CF (1995) 3-Hexaprenyl-4-hydroxybenzoic acid forms a predominant intermediate pool in ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* **320**(2): 305-314

Proft M, Kotter P, Hedges D, Bojunga N, Entian KD (1995) CAT5, a new gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**(24): 6116-6126

Q

Quinzii CM, DiMauro S, Hirano M (2007) Human coenzyme Q10 deficiency. *Neurochem Res* **32**(4-5): 723-727

Quinzii CM, Hirano M (2010) Coenzyme Q and mitochondrial disease. *Dev Disabil Res Rev* **16**(2): 183-188

R

Rahman S, Hargreaves I, Clayton P, Heales S (2001) Neonatal presentation of coenzyme Q10 deficiency. *J Pediatr* **139**(3): 456-458

Rea SL, Graham BH, Nakamaru-Ogiso E, Kar A, Falk MJ (2010) Bacteria, yeast, worms, and flies: exploiting simple model organisms to investigate human mitochondrial diseases. *Dev Disabil Res Rev* **16**(2): 200-218

Rodel G (1986) Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader. *Curr Genet* **11**(1): 41-45

Rohmer M (1999) The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep* **16**(5): 565-574

Rotig A, Appelkvist EL, Geromel V, Chretien D, Kadhon N, Edery P, Lebeideau M, Dallner G, Munnich A, Ernster L, Rustin P (2000) Quinone-responsive multiple respiratory-chain dysfunction due to widespread coenzyme Q10 deficiency. *Lancet* **356**(9227): 391-395

Rudney H, Parson WW (1963) Conversion of p-hydroxybenz-aldehyde to benzoquinone ring of ubiquinone in *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem* **238**(9): 3137-3138

S

Salviati L, Trevisson E, Rodriguez Hernandez MA, Casarin A, Pertegato V, Doimo M, Cassina M, Agosto C, Desbats MA, Sartori G, Sacconi S, Memo L, Zuffardi O, Artuch R, Quinzii C, Dimauro S, Hirano M, Santos-Ocana C, Navas P (2012) Haploinsufficiency of *COQ4* causes coenzyme Q₁₀ deficiency. *J Med Genet* **49**(3): 187-191

Schmelzer C, Lindner I, Vock C, Fujii K, Doring F (2007) Functional connections and pathways of coenzyme Q10-inducible genes: an in-silico study. *IUBMB Life* **59**(10): 628-633

Sheftel AD, Stehling O, Pierik AJ, Elsasser HP, Muhlenhoff U, Webert H, Hobler A, Hannemann F, Bernhardt R, Lill R (2010) Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(26): 11775-11780

Shen Y, Goldsmith-Fischman S, Atreya HS, Acton T, Ma L, Xiao R, Honig B, Montelione GT, Szyperski T (2005) NMR structure of the 18 kDa protein CC1736 from *Caulobacter crescentus* identifies a member of the START domain superfamily and suggests residues mediating substrate specificity. *Proteins* **58**(3): 747-750

Soballe B, Poole RK (1998) Requirement for ubiquinone downstream of cytochrome(s) b in the oxygen-terminated respiratory chains of *Escherichia coli* K-12 revealed using a null mutant allele of *ubiCA*. *Microbiology-Uk* **144**: 361-373

Stadtman ER, Levine RL (2000) Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* **899**: 191-208

Stenmark P, Grunler J, Mattsson J, Sindelar PJ, Nordlund P, Berthold DA (2001) A new member of the family of di-iron carboxylate proteins. Coq7 (*clk-1*), a membrane-bound hydroxylase involved in ubiquinone biosynthesis. *J Biol Chem* **276**(36): 33297-33300

T

Takahashi S, Ohtani T, Satoh H, Nakamura Y, Kawamukai M, Kadowaki K (2010) Development of coenzyme Q10-enriched rice using sugary and shrunken mutants. *Biosci Biotechnol Biochem* **74**(1): 182-184

Tauche A, Krause-Buchholz U, Rodel G (2008) Ubiquinone biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the molecular organization of O-methylase Coq3p depends on Abc1p/Coq8p. *FEMS Yeast Res* **8**(8): 1263-1275

Tran UC, Clarke CF (2007) Endogenous synthesis of coenzyme Q in eukaryotes. *Mitochondrion* **7 Suppl**: S62-71

Tran UC, Marbois B, Gin P, Gulmezian M, Jonassen T, Clarke CF (2006) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* *coq7* mutants by mitochondrial targeting of the *Escherichia coli* UbiF polypeptide: two functions of yeast Coq7 polypeptide in coenzyme Q biosynthesis. *J Biol Chem* **281**(24): 16401-16409

Trumpower BL (1976) Evidence for a protonmotive Q cycle mechanism of electron transfer through the cytochrome b-c1 complex. *Biochem Biophys Res Commun* **70**(1): 73-80

Turrens JF, Alexandre A, Lehninger AL (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **237**(2): 408-414

Turunen M, Olsson J, Dallner G (2004) Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* **1660**(1-2): 171-199

Tzagoloff A, Akai A, Foury F (1976) Assembly of mitochondrial-membrane system. 16. modified form of atpase proteolipid in oligomycin- resistant mutants of *saccharomyces-cerevisiae*. *FEBS Lett* **65**(3): 391-395

Tzagoloff A, Dieckmann CL (1990) Pet genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **54**(3): 211-225

Tzagoloff A, Jang J, Glerum DM, Wu M (1996) FLX1 codes for a carrier protein involved in maintaining a proper balance of flavin nucleotides in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **271**(13): 7392-7397

V

Vajo Z, King LM, Jonassen T, Wilkin DJ, Ho N, Munnich A, Clarke CF, Francomano CA (1999) Conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1* from yeast to human: a gene required for ubiquinone biosynthesis with potential implications for aging. *Mamm Genome* **10**(10): 1000-1004

van Berkel WJH, Kamerbeek NM, Fraaije MW (2006) Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J Biotechnol* **124**(4): 670-689

W

Wierenga RK, Terpstra P, Hol WG (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* **187**(1): 101-107

Wu M, Repetto B, Glerum DM, Tzagoloff A (1995) Cloning and characterization of FAD1, the structural gene for flavin adenine-dinucleotide synthetase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**(1): 264-271

X

Xie LX, Hsieh EJ, Watanabe S, Allan CM, Chen JY, Tran UC, Clarke CF (2011) Expression of the human atypical kinase ADCK3 rescues coenzyme Q biosynthesis and phosphorylation of Coq polypeptides in yeast *coq8* mutants. *Biochim Biophys Acta* **1811**(5): 348-360

Y

Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Leger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* **299**(5607): 700-704

Z

Zampol MA, Busso C, Gomes F, Ferreira-Junior JR, Tzagoloff A, Barros MH (2010) Over-expression of *COQ10* in *Saccharomyces cerevisiae* inhibits mitochondrial respiration. *Biochem Biophys Res Commun* **402**(1): 82-87

Zhang Z, Huang L, Shulmeister VM, Chi YI, Kim KK, Hung LW, Crofts AR, Berry EA, Kim SH (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature* **392**(6677): 677-684

Annexe

Le coenzyme Q (ubiquinone ou Q) est une molécule organique lipophile composée d'une benzoquinone substituée et d'une chaîne polyisoprényle contenant 6 unités chez *Saccharomyces cerevisiae* (Q₆), 8 chez *Escherichia coli* (Q₈) et 10 chez l'homme (Q₁₀). Q a un rôle bien connu de transporteur d'électrons dans les chaînes respiratoires et fonctionne également comme un antioxydant membranaire. La déficience primaire en Q₁₀ a maintenant été attribuée à des mutations dans 6 gènes de la biosynthèse de Q₁₀ et cause des pathologies sévères. La biosynthèse de Q₆ est mitochondriale et nécessite au moins 9 protéines organisées au sein d'un complexe multiprotéique chez la levure (Coq1-Coq9). L'acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB) et l'acide para-aminobenzoïque (pABA) sont les deux précurseurs connus du noyau aromatique de Q₆. Malgré de nombreuses recherches et l'importance cruciale de Q dans le métabolisme eucaryote, certaines étapes de la voie de biosynthèse de Q ne sont pas connues. L'étude présentée dans ce manuscrit a permis de montrer l'implication de la protéine Coq6, proposée comme étant une mono-oxygénase à flavine, dans une seule des trois réactions d'hydroxylation que compte la voie de biosynthèse de Q₆: l'hydroxylation en C5. De plus, notre étude sur Coq8, une protéine kinase dont sa surexpression stabilise le complexe multiprotéique, nous a permis de confirmer les fonctions de certaines protéines Coq (Coq5, Coq7), de découvrir la fonction de Coq6 et d'éclaircir le rôle des autres (Coq4, Coq9). Nous rapportons également que des analogues hydroxylés ou méthoxylés de 4-HB et du pABA peuvent court-circuiter des étapes déficientes des mutants particuliers conduisant ainsi à la synthèse du coenzyme Q₆ dans ces derniers. Ce résultat ouvre de nouvelles perspectives pour traiter les déficiences en coenzyme Q₁₀ qui jusqu'à présent sont traitées par supplémentation en Q. Finalement, la réaction de déamination, essentielle à la biosynthèse de Q₆ à partir du pABA, reste incomprise mais nos résultats suggèrent fortement l'implication de Coq6 dans cette étape.

MOTS CLES: Coenzyme Q, Coq6, Coq8, *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondrie, respiration.

Coenzyme Q (ubiquinone or Q) is a lipophilic organic molecule composed of a substituted benzoquinone and a polyisoprenyl chain containing 6 units in *Saccharomyces cerevisiae* (Q₆), 8 in *Escherichia coli* (Q₈) and 10 in humans (Q₁₀). Q has a well known role as an electron carrier in the mitochondrial respiratory chain and also functions as a membrane soluble antioxidant. Primary Q₁₀ deficiency has now been linked to mutations in six genes of Q biosynthesis and results in severe pathologies. The biosynthesis of Q is mitochondrial and requires at least nine proteins in yeast (Coq1-Coq9). 4-hydroxybenzoate (4-HB) and para-aminobenzoic acid (pABA) are the long-known aromatic precursors of the benzoquinone ring of Q. Despite intensive research efforts and the biological importance of Q, some biosynthetic steps are still uncharacterized. Herein we report that Coq6, a predicted flavin-dependent monooxygenase, is involved exclusively in the C5-hydroxylation reaction. We also demonstrate that the overexpression of the protein Coq8, which is proposed to be a kinase, in Δ coq strains restores steady state levels of the unstable Coq proteins. Moreover, we provide evidence that the kinase activity is essential for the stabilizing effect of Coq8 in the Δ coq strains. The overexpression of Coq8 helped us clarify the role of some proteins (Coq4, Coq9). We also show that using synthetic analogues of 4-HB and pABA allows bypassing deficient biosynthetic steps in some mutants. This result opens new perspectives to address the deficiencies in coenzyme Q which until now are processed by Q supplementation. Finally, the deamination reaction, which is essential for Q₆ biosynthesis from pABA remains misunderstood but our results strongly suggest the involvement of Coq6 in this step.

KEYWORDS: Coenzyme Q, Coq6, Coq8, *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondria, respiration.